

**MARTA DOS SANTOS FERREIRA ALVES**

**AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO POR  
MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS NUMA  
COLÓNIA DE GATOS ERRANTES DA ILHA DE  
FARO**

**Orientadora:** Professora Doutora Margarida Alves

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias**

**Faculdade de Medicina Veterinária**

Lisboa

2017

**MARTA DOS SANTOS FERREIRA ALVES**

**AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO POR  
MICOPLASMAS HEMOTRÓPICOS NUMA  
COLÓNIA DE GATOS ERRANTES DA ILHA DE  
FARO**

Dissertação defendida em provas públicas para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, no dia 6 de Junho de 2017 perante o JÚRI nomeado pelo seguinte Despacho Reitoral nº138/2017 com a seguinte composição

**Membros do júri:**

**Presidente: Professora Doutora Laurentina Pedroso**

**Vogal: Professora Doutora Michelle Serafim**

**Arguente: Professora Doutora Nazaré Cunha**

**Orientadora: Professora Doutora Margarida Alves**

**Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias**

**Faculdade de Medicina Veterinária**

Lisboa

2017

A presente dissertação foi escrita de acordo com a antiga grafia.

## Epígrafe

### *Ode ao Gato*

*“Tu e eu temos de permeio  
a rebeldia que desassossega,  
a matéria compulsiva dos sentidos.  
Que ninguém nos dome,  
que ninguém tente  
reduzir-nos ao silêncio branco da cinza,  
pois nós temos fôlegos largos  
de vento e de névoa  
para de novo nos erguermos  
e, sobre o desconsolo dos escombros,  
formarmos o salto  
que leva à glória ou à morte,  
conforme a harmonia dos astros  
e a regra elementar do destino.”*

*(José Jorge Letria)*

## **Dedicatória**

*Dedico este trabalho à minha família:*

À minha mãe, a melhor amiga que uma pessoa pode ter, por todo o apoio incondicional

Ao meu pai por ser o melhor do mundo e me permitir seguir o meu sonho, mesmo não  
podendo ver-me a atingi-lo

À minha avó paterna que sempre me incentivou a lutar pelos meus sonhos com afinco

Aos meus avós que já partiram: à minha avó por ter sempre acreditado em mim e nas  
minhas potencialidades e ao meu avô por ter estimulado o meu gosto pela ciência desde  
tenra idade

## **Agradecimentos**

Antes de mais gostaria de agradecer à minha orientadora Professora Doutora Margarida Alves por toda a atenção, disponibilidade e dedicação demonstrada durante todo o processo de estágio e elaboração desta dissertação, assim como agradecer pelo facto de ter podido trabalhar num tema tão interessante.

Agradeço à Professora Ana Lúcia Rodrigues pela paciência, atenção e carinho com que me recebeu no Laboratório, sua profunda amizade e por tudo quanto com ela pude aprender; ao Professor Doutor Pedro Faísca por me ter convencido a estagiar no Laboratório da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (FMV-ULHT); à Doutora Vera Pereira pela disponibilidade e por me ter ensinado quase tudo o que sei dentro da Patologia Clínica Veterinária. A todos com quem tive o privilégio de trabalhar e contactar no Laboratório da FMV-ULHT e ao longo de todo o curso e que me permitiram melhorar diariamente, quer professores quer clínicos, enfermeiras, funcionários e alunos, um grande obrigado.

Um Muito Obrigada à Professora Doutora Inês Viegas pela preciosa ajuda na parte estatística e de apresentação dos resultados.

Agradeço à minha família, em especial à minha mãe e à minha avó por todo o apoio incondicional e compreensão, principalmente em alturas de crise e dúvidas; ao meu pai que me permitiu estudar nesta área tão apaixonante e me acalentou o sonho, e a todos os familiares que, de alguma forma, quer por acreditarem nas minhas capacidades quer por utilização de palavras de encorajamento, permitiram que persistisse na busca do que gosto.

A todos os meus amigos, que me aturaram e ajudaram, mesmo quando não acreditava em mim própria; por buscarem sempre que demonstre o melhor de mim e a todos os outros que fizeram de mim aquilo que hoje sou, o meu mais sincero obrigada.

Por último, agradeço à minha cadelinha o ter-me ensinado a amar e estimulado em mim o desejo de seguir a nobre profissão de Médica Veterinária.

## Resumo

Os micoplasmas hemotrópicos são agentes bacterianos que infectam os eritrócitos. Existem quatro espécies que se sabe infectarem os gatos: *Mycoplasma haemofelis*, “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”, “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” e “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*”. Foi objectivo do presente trabalho avaliar, por diagnóstico molecular, numa amostra de 157 gatos errantes que habitam a ilha de Faro, a presença de infecção por *Mycoplasma* spp. Nestes animais foi feita a recolha de sangue periférico, tendo, ainda, sido recolhidos dados referentes à idade, sexo, presença de ectoparasitas e sinais clínicos exibidos. A detecção de Ácido Desoxirribonucleico (DNA, do inglês “Desoxirribonucleic Acid”) de *Mycoplasma* spp. foi feita através de Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês “Polymerase Chain Reaction”) e a identificação da espécie por hidrólise com enzimas de restrição. A reacção de PCR permitiu encontrar um total de 20,4% de gatos infectados com *Mycoplasma* spp. As diferentes espécies apresentaram a seguinte distribuição: “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” foi o mais prevalente, com 7% em infecção única, seguido de *Mycoplasma haemofelis* com 4,46%. “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” foi detectado em 1,27% das amostras. A infecção mista com *Mycoplasma haemofelis* e “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” foi encontrada em 7,64% dos animais. A análise dos factores de risco demonstrou que o ser macho e a idade adulta foram factores de risco para a infecção por hemoplasmose, mas não a presença de pulgas. Os micoplasmas hemotrópicos são agentes ubiqüitários, distribuídos mundialmente, com uma prevalência real variável mas significativa, existindo várias espécies capazes de infectar os gatos. Estas espécies devem ser distinguidas devido às diferenças de potencial patogénico, sendo o método de detecção mais eficaz a PCR.

Palavras-chave: *Mycoplasma* spp., Hemoplasmose, PCR, Gato, Ilha de Faro

## Abstract

Hemotrophic mycoplasmas are bacterial agents that infect the red blood cells. There are four species known to infect cats: *Mycoplasma haemofelis*, “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”, “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” and “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*”. The aim of this study was to evaluate, by molecular diagnosis, in a sample of 157 stray cats from Ilha de Faro, the presence of *Mycoplasma* spp. In these animals peripheral blood was collected, as well as data regarding age, sex, presence of ectoparasites and clinical signs exhibited. The detection of *Mycoplasma* spp. Deoxyribonucleic Acid (DNA) was performed by Polymerase Chain Reaction (PCR) and species identification by hydrolysis with restriction enzymes. PCR reaction allowed to find 20,4% of the studied cats infected with *Mycoplasma* spp. The different species were distributed as follows: “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” was the most prevalent, with 7% in single infection, followed by *Mycoplasma haemofelis* with 4,46%. “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” was detected in 1,27% of the samples. Mixed infection with *Mycoplasma haemofelis* and “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” was found in 7,64% of the animals. The analysis of risk factors showed that male sex and adulthood were risk factors for hemoplasmosis infection, but not the presence of fleas. The mycoplasmas are ubiquitous hemotrophic agents distributed worldwide, with an actual prevalence variable but significant. There are several species capable of infecting cats. These species should be distinguished due to its differences in the pathogenic potential. PCR is the most effective detection method.

Keywords: *Mycoplasma* spp, Hemoplasmosis, PCR, Cat, Ilha de Faro



## Lista de siglas, símbolos, acrônimos e abreviaturas

% – Percentagem

$\times g$  – Aceleração gravitacional (unidade de força centrífuga relativa)

$\mu\text{L}$  – Microlitro

$\mu\text{m}$  – Micrómetro

16S rRNA – Subunidade 16S do Ácido Ribonucleico Ribossômico, do inglês “16S Ribosomal Ribonucleic Acid”

ACVIM – Colégio Americano de Medicina Interna Veterinária, do inglês “American College of Veterinary Internal Medicine”

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

CMhm – “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”

CMhp – “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*”

CMt – “*Candidatus Mycoplasma turicensis*”

CPDA-1 – Solução anticoagulante de citrato de adenina-dextrose-fosfato, do inglês “Anticoagulant Citrate Phosphate Dextrose Adenine Solution”

CPK – Creatina fosfoquinase

DNA – Ácido Desoxirribonucleico, do inglês “Desoxiribonucleic acid”

dNTPs – Desoxiribonucleósidos trifosfato

EDTA – Ácido etilenodiaminetetraacético, do inglês “Ethylenediaminetetraacetic acid”

*Et al.* – E outros, da locução latina “*et alli*”

EUA – Estados Unidos da América

FeLV – Vírus da Leucemia Felina, do inglês “Feline Leukemia Virus”

FIV – Vírus da Imunodeficiência Felina, do inglês “Feline Immunodeficiency Virus”

FMV – Faculdade de Medicina Veterinária

g – Grama

gDNA – DNA genómico

GGT – Gama Glutamil Transferase

h – Hora

HCT – Hematócrito

IFI – Imunofluorescência Indirecta

kb – Kilobase

kg – Quilograma

LACH – Laboratório de Análises Clínicas e Histopatologia

m/v – Massa por volume

mg – Miligrama

MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de Magnésio

Mhf – *Mycoplasma haemofelis*

mL – Mililitro

mM – Milimolar

nm – Nanómetro

°C – Graus Celsius

Pb – Pares de bases

PBS – Tampão fosfato salino, do inglês “Phosphate-Buffered Saline”

PCR – Reacção em Cadeia da Polimerase, do inglês “Polymerase Chain Reaction”

PIF – Peritonite Infecciosa Felina

PO – Por via oral, da locução latina “*per os*”

rRNA – RNA ribossomal

RFLP – Polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição, do inglês “Restriction Fragment Length Polymorphism”

RNA – Ácido Ribonucleico, do inglês “Ribonucleic Acid”

RNase P – ribonuclease P, do inglês “P RNase”

SID – Uma vez ao dia, da locução latina “*semel in die*”

TBE – Tris-Borato-EDTA

TSA – Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos

UI – Unidades Internacionais

ULHT – Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

V – Volt

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

pmol – Picomol

# ÍNDICE GERAL

	Página
I – Actividades desenvolvidas durante o estágio curricular.....	16
1 – Introdução.....	16
2 – Áreas de actuação.....	17
2.1 – Hematologia.....	17
2.2 – Bioquímica sanguínea.....	18
2.3 – Urianálise.....	19
2.4 – Citologia.....	20
2.5 – Microbiologia.....	21
2.6 – Parasitologia.....	22
2.7 – Serologia.....	22
II – Pesquisa de Micoplasmas Hemotrópicos em gatos errantes da Ilha de Faro-	23
1 – Introdução teórica.....	23
1.1 – Abordagem histórica e nomenclatura.....	23
1.2 – Etiologia e filogenia.....	26
1.3 – Morfologia.....	27
1.4 – Epidemiologia.....	31
1.4.1 – Hemoplasmose em Portugal.....	31
1.4.2 – Hemoplasmose no Mundo.....	35
1.5 – Factores de risco.....	36
1.6 – Vias de transmissão.....	39
1.6.1 – Transmissão por vectores artrópodes.....	39
1.6.2 – Transmissão horizontal.....	40
1.6.3 – Transmissão interespecífica.....	41
1.6.4 – Transmissão iatrogénica por transfusão sanguínea.....	42
1.6.5 – Outras vias de transmissão.....	43
1.7 – Patogenia.....	43
1.7.1 – Mecanismos de patogenicidade.....	43
1.7.2 – Diferenças de patogenicidade e imunidade entre as	46
diferentes espécies de hemoplasmas.....	48
1.8 – Sinais clínicos e alterações laboratoriais.....	50
1.9 – Achados histopatológicos.....	51
1.10 – Diagnóstico.....	51
1.10.1 – Diagnósticos diferenciais.....	51
1.10.2 – Abordagem diagnóstica genérica.....	52
1.10.3 – Diagnóstico citológico.....	53
1.10.4 – Diagnóstico molecular.....	56
1.10.5 – Outros meios de diagnóstico.....	56
1.11 – Tratamento.....	58
1.12 – Prevenção.....	59
1.13 – Implicações na saúde pública.....	59

2 – Material e métodos.....	61
2.1– Descrição da população.....	61
2.2 – Extração de DNA.....	62
2.3 – Avaliação do grau de pureza do DNA genómico e sua integridade física.....	63
2.4 – Amplificação dos genes de interesse por PCR.....	64
2.4.1 – Amplificação do gene da Beta-Glucuronidase Felina ( <i>fGUSB</i> ).....	64
2.4.2 – Amplificação de DNA de Micoplasmas Hemotrópicos Felinos.....	66
2.5 – Hidrólise dos Produtos de PCR com enzimas de restrição para identificação da espécie de <i>Mycoplasma</i> spp.....	67
2.6 – Purificação e sequenciação dos fragmentos amplificados por PCR.....	68
2.7 – Análise Estatística.....	70
3 – Resultados.....	71
3.1 – Estatística descritiva da população em estudo.....	71
3.2 – Avaliação da integridade física do DNA genómico.....	72
3.3 – Amplificação, por PCR, de um fragmento do gene <i>fGUSB</i> .....	73
3.4 – Amplificação, por PCR, de DNA de <i>Mycoplasma</i> spp.....	73
3.5 – Relação entre a infecção por <i>Mycoplasma</i> spp. e as variáveis categóricas.....	74
3.6 – Identificação da espécie de hemoplasma.....	76
3.7 – Avaliação de factores de risco.....	78
3.7.1 – Sexo.....	78
3.7.2 – Classe de Idade.....	79
3.7.3 – Presença de Pulgas.....	80
3.7.4 – Variáveis intrínsecas e sua relação com a infecção por <i>Mycoplasma</i> spp.....	80
4 – Discussão dos Resultados.....	81
5 – Conclusão.....	86
6 – Referências bibliográficas.....	87
Apêndice I.....	i
Apêndice II.....	ii
Apêndice III.....	iv

## ÍNDICE DE TABELAS

	Página
<b>Tabela 1</b> – Comparação entre as diferentes espécies de micoplasmas hemotrópicos felinos.....	25
<b>Tabela 2</b> – Resumo dos estudos epidemiológicos sobre a prevalência da infecção por <i>Mycoplasma</i> spp. em Portugal.....	33
<b>Tabela 3</b> – Lista de diagnósticos diferenciais .....	51
<b>Tabela 4</b> – Sequência dos primers específicos para amplificação de um fragmento do gene <i>fGUSB</i> .....	65
<b>Tabela 5</b> – Sequência dos primers universais para <i>Mycoplasma</i> spp.....	66
<b>Tabela 6</b> – Perfis de restrição dos produtos de PCR para identificação da espécie de micoplasma.....	68
<b>Tabela 7</b> – Distribuição relativa de sinais clínicos obtidos nos gatos com resultado de PCR positivo para <i>Mycoplasma</i> spp.....	76
<b>Tabela 8</b> – Frequências das diferentes espécies de hemoplasma encontradas, em infecção única e em co-infecção.....	78
<b>Tabela 9</b> – Espécies de micoplasmas hemotrópicos presentes nas amostras com amplificação positiva.....	ii
<b>Tabela 10</b> – Resumo dos dados recolhidos para cada um dos gatos positivos para <i>Mycoplasma</i> spp.....	iv

# ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1</b> – Distribuição das diferentes técnicas hematológicas realizadas e respectiva frequência.....	17
<b>Figura 2</b> – Frequência dos diferentes exames de bioquímica sanguínea efectuados.....	18
<b>Figura 3</b> – Distribuição de técnicas de urianálise efectuadas e respectiva frequência.....	19
<b>Figura 4</b> – Distribuição das diferentes técnicas microbiológicas efectuadas e respectiva frequência.....	21
<b>Figura 5</b> – Técnicas parasitárias efectuadas e respectiva frequência.....	22
<b>Figura 6</b> – Diferentes testes serológicos efectuados e respectiva frequência.....	22
<b>Figura 7</b> – <i>Mycoplasma haemofelis</i> no esfregaço sanguíneo de um gato infectado, com anemia regenerativa, observando-se a forma de anel, cocóide e em bastonete .	28
<b>Figura 8</b> – “ <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ” no esfregaço sanguíneo de um gato infectado com formas cocóides, e anemia moderada com ausência de regeneração.....	28
<b>Figura 9</b> – Fotomicrografia de microscopia electrónica de eritrócitos de um gato infectado com <i>Mycoplasma haemofelis</i> .....	29
<b>Figura 10</b> – Percentagem de sinais clínicos exibidos referente aos gatos dos quais se tinha informação.....	72
<b>Figura 11</b> – Electroforese em gel de agarose a 0,8% do DNA genómico extraído...	72
<b>Figura 12</b> – Electroforese em gel de agarose a 1,5%, de amostras com amplificação bem-sucedida para o gene <i>fGUSB</i> .....	73
<b>Figura 13</b> – Electroforese em gel de agarose a 1,5% do produto de PCR de quatro amostras com amplificação bem-sucedida para o gene <i>16S rRNA</i> de <i>Mycoplasma</i> spp.....	74
<b>Figura 14</b> – Relação entre a positividade da PCR para <i>Mycoplasma</i> spp. e o sexo dos animais.....	74
<b>Figura 15</b> – Relação entre a positividade da PCR para <i>Mycoplasma</i> spp. e a idade dos animais.....	75
<b>Figura 16</b> – Relação entre a positividade da PCR para <i>Mycoplasma</i> spp. e a presença de pulgas.....	75
<b>Figura 17</b> – Gel de agarose após electroforese dos fragmentos de restrição pelas endonucleases <i>Tai</i> I, <i>EcoR</i> I e <i>Xce</i> I.....	77
<b>Figura 18</b> – Relação entre a presença de infecção por <i>Mycoplasma</i> spp. e o sexo enquanto factor de risco.....	79
<b>Figura 19</b> – Relação entre a presença de infecção por <i>Mycoplasma</i> spp. e a classe de idade enquanto factor de risco.....	80

# **I – Actividades desenvolvidas durante o estágio curricular**

## **1 – Introdução**

A autora desenvolveu o seu estágio curricular do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária no Laboratório de Análises Clínicas e Histopatologia (LACH) da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (ULHT). Este teve a duração de quatro meses e meio, tendo decorrido de 1 de Setembro de 2015 a 15 de Janeiro de 2016, sob a orientação da Professora Doutora Margarida Alves. O estágio constou, essencialmente, de duas partes: i) projecto de investigação conducente à elaboração da dissertação de mestrado e ii) realização de exames laboratoriais na área da Patologia Clínica, realizados no laboratório que serve de apoio ao Hospital Escolar Veterinário da FMV-ULHT.

Relativamente à primeira parte, com uma duração aproximada de dois meses, foram efectuadas várias técnicas moleculares para a totalidade das amostras em estudo, que serão descritas em pormenor mais à frente na presente dissertação.

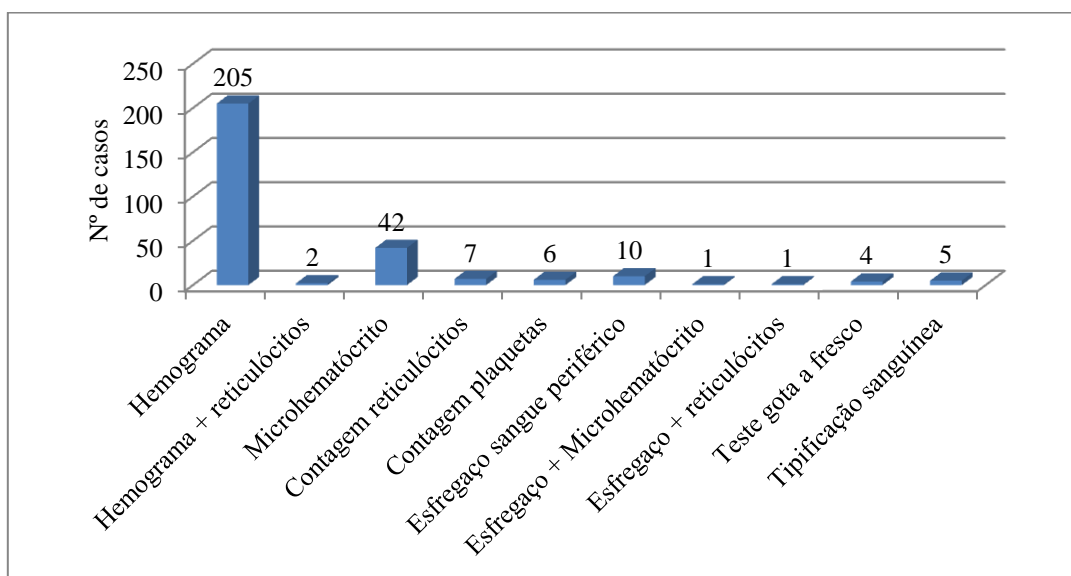
Durante a segunda parte do estágio, foram efectuados: hemogramas, bioquímicas sanguíneas várias, observação de esfregaços sanguíneos, observação de citologias (auriculares, oculares, de massas, de exsudados provenientes de várias regiões anatómicas), urianálises, ionogramas, testes endocrinológicos, análises bacteriológicas, pesquisa de parasitas e serologias, de acordo com a informação que se segue sob a forma de gráficos, e distribuída por áreas de actuação dentro da Patologia Clínica, perfazendo a totalidade de 1562 análises. Esta parte do estágio teve uma duração aproximada de dois meses e meio.



## 2 – Áreas de actuação

### 2.1 – Hematologia

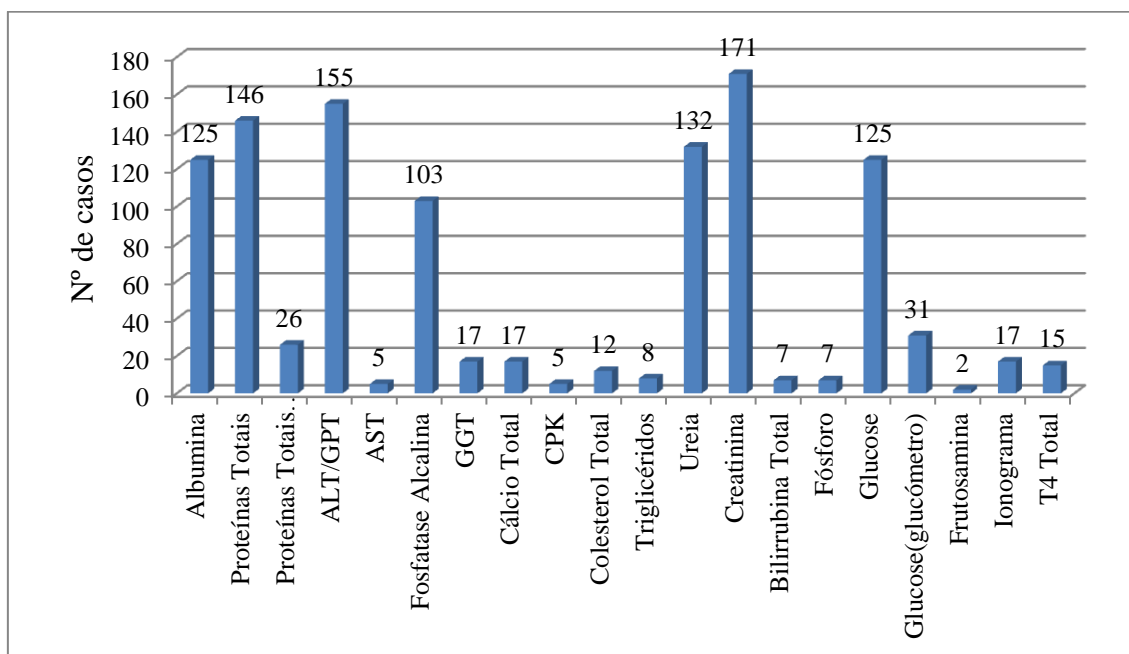
Na área de hematologia, a mais abrangente durante a realização do estágio (figura 1), além dos hemogramas, efectuados num equipamento BC-5300Vet (Mindray), analisaram-se vários esfregaços sanguíneos de sangue periférico, correspondentes a alguns dos hemogramas efectuados. Os esfregaços foram corados com Giemsa (Bio-Optica Index) e observados ao microscópio óptico. Nestes, verificava-se se existiam sinais de possível regeneração em anemias (anisocitoses, policromasias, alterações conformacionais eritrocitárias), a presença de alterações tóxicas nos neutrófilos, de agregados plaquetários e a confirmação das contagens de algumas linhas celulares, nomeadamente leucocitárias. Nalguns casos, observava-se a presença de formas imaturas de eritrócitos (por exemplo, metarrubricitos) e de leucócitos, nomeadamente neutrófilos em banda. Uma das técnicas efectuadas foi a contagem de reticulócitos com recurso ao corante Azul Cresil Brilhante para avaliar o nível de regeneração nas anemias. Nos casos em que havia trombocitopenia verdadeira foi feita a contagem de plaquetas. Foram efectuadas várias tipificações sanguíneas pré-transfusionais e testes de gota a fresco para averiguar a presença de microfilárias. Foram, ainda, realizados vários microhematócritos, uma abordagem rápida e prática para determinação de hematócrito.



**Figura 1** – Distribuição das diferentes técnicas hematológicas realizadas e respectiva frequência.

## 2.2 – Bioquímica sanguínea

As bioquímicas sanguíneas foram realizadas num equipamento Spotchem EZ SP 4430 Arkray (Menarini), em plasma heparinizado ou soro. As análises realizadas estão evidenciadas na figura 2.

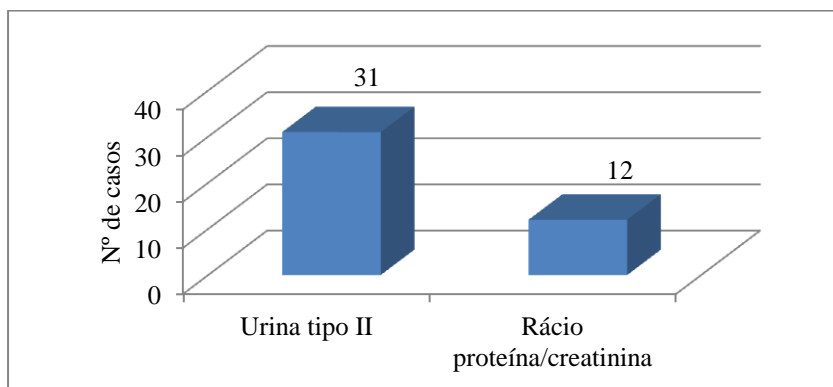


**Figura 2** – Frequência dos diferentes exames de bioquímica sanguínea efectuados. ALT/GPT – Alanina Aminotransferase. AST – Aspartato Aminotransferase. CPK – Creatina Fosfoquinase. GGT – Gama Glutamil Transferase.

A hormona tiroideia, denominada tiroxina (T4) total, embora considerada como análise endocrinológica, e sendo a única de endocrinologia a ser efectuada no LACH, foi aqui incluída por questões de natureza prática. Esta foi efectuada com recurso ao SNAP T4 Test Kit (IDEXX Laboratories), no equipamento Vet Test 8008 (IDEXX). Os ionogramas foram, também, realizados recorrendo-se a cassetes específicas, tendo sido efectuados num equipamento Vet Stat Electrolyte and Gas Analyzer (IDEXX).

### 2.3 – Urianálise

Nesta área da Patologia Clínica, efectuaram-se várias urianálises, tal como evidenciado na figura 3. Estas contemplaram a avaliação de vários parâmetros macroscópicos como cor, aspecto, cheiro, densidade urinária e avaliação de outros parâmetros, nomeadamente, proteína e hemoglobina na tira urinária.



**Figura 3** – Distribuição de técnicas de urianálise efectuadas e respectiva frequência.

Os sedimentos urinários foram, sempre, observados ao microscópio, sendo os cristais mais visualizados os de estruvite, seguidos dos de oxalato de cálcio. Numa das observações distinguiram-se cristais de xantina num animal a fazer tratamento para a leishmaniose com Alopurinol. Nalguns casos foi, ainda, possível visualizar presença de um número elevado de células de descamação, leucócitos e/ou eritrócitos, assim como presença de bactérias, indicando infecção urinária; outros tinham cilindros de diferentes tipos. Nos machos, foi possível observar espermatozóides, achado sem significado patológico. O rácio proteína/creatinina foi efectuado para averiguar o estado do metabolismo renal dos animais num equipamento Vet Test 8008 (IDEXX).

## 2.4 – Citologia

Durante o período de estágio, foram realizadas 60 citologias. Estas foram coradas com Giemsa (Bio-Optica Index). Nas citologias auriculares observou-se a existência de células inflamatórias e, no caso de inflamação purulenta, foi tida particular atenção para o sobrecrecimento de *Malassezia* spp., a presença de bactérias fagocitadas ou por fagocitar, a presença de ácaros e existência de tumores ou pólipos. Numa citologia auricular comum observam-se, com frequência, queratina e células de descamação.

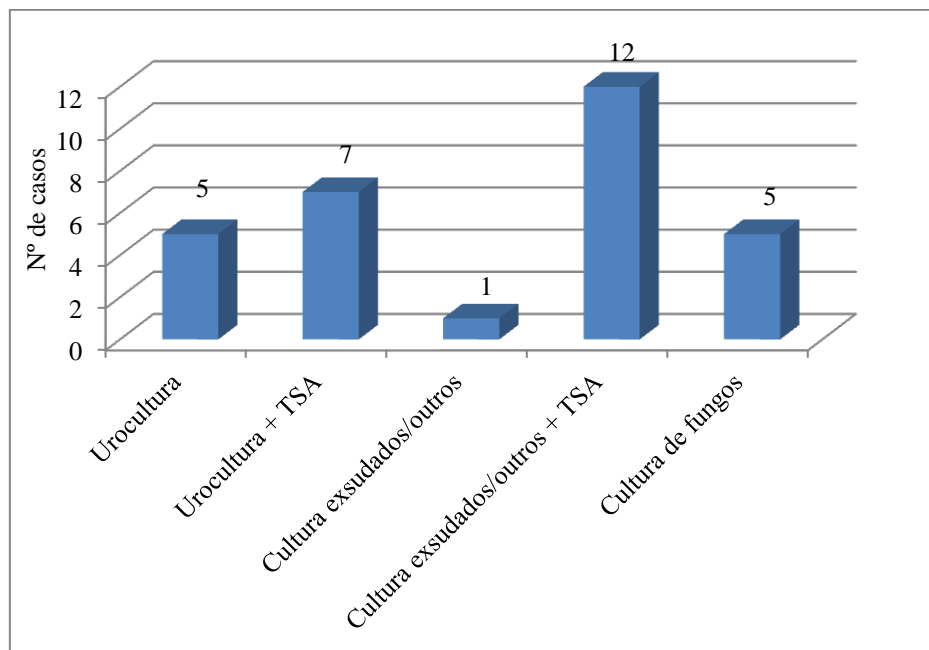
No caso de citologias oculares foi possível observar presença de células inflamatórias, associadas, ou não, a bactérias.

Observaram-se várias citologias de massas provenientes de diversas regiões anatómicas com suspeita tumoral, tendo sido caracterizadas as diferentes morfologias celulares. Dos tumores observados destacam-se: mastocitomas, linfomas, lipomas, tumores venéreos transmissíveis e tumores vários de natureza epitelial ou mesenquimatosa.

As citologias menos frequentes foram as de uma lavagem broncoalveolar, num caso com forte suspeita de Peritonite Infecciosa Felina (PIF), outro de uma neoplasia epitelial e uma citologia de lipidose hepática.

## 2.5 – Microbiologia

Na microbiologia, a urocultura foi das análises mais realizadas, como observável na figura 4. As restantes culturas foram de diversos exsudados, com o respectivo antibiograma, técnica realizada com a finalidade de identificar os antibióticos aos quais o(s) agente(s) são resistentes e sensíveis, para se poder definir uma terapêutica adequada.

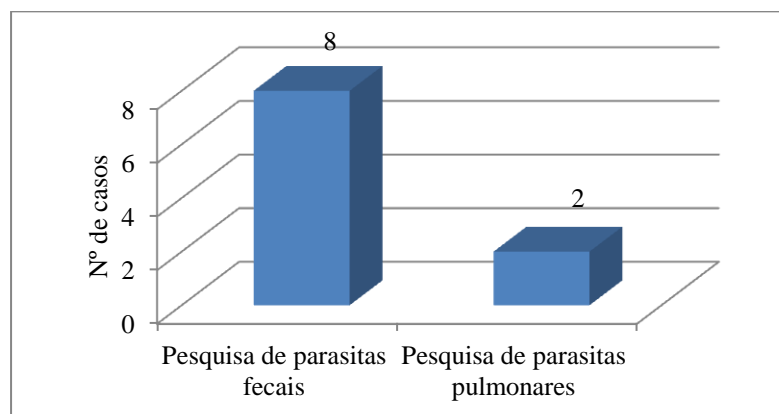


**Figura 4** – Distribuição das diferentes técnicas microbiológicas efectuadas e respectiva frequência. TSA – Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos.

A cultura de fungos foi uma análise requisitada, com frequência, em pêlos, nos quais se observavam, por exemplo, dermatófitos como *Trychophyton* spp., após coloração com Azul de Lactofenol (Merck).

## 2.6 – Parasitologia

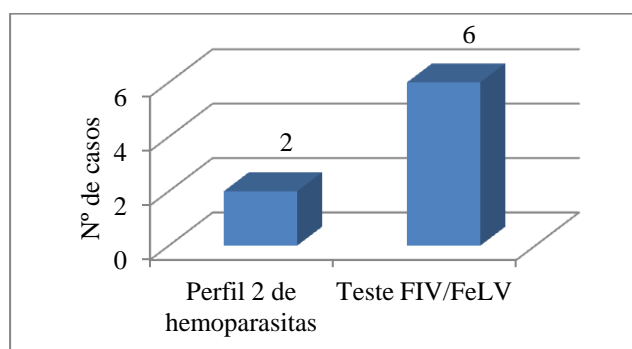
No que diz respeito às técnicas parasitológicas realizadas (figura 5), recorreu-se, principalmente, à técnica de Willis ou flutuação para pesquisar a existência de ovos e oocistos, em fezes de um único dia ou de vários dias.



**Figura 5** – Técnicas parasitárias efectuadas e respectiva frequência.

## 2.7 – Serologia

Os testes serológicos efectuados, tal como visível na figura 6, foram: o teste de FIV/FelV, que consistiu num teste rápido SNAP Combo Plus FelV Antigen/FIV Antibody test Kit (IDEXX Laboratories) feito em plasma ou soro e o perfil 2 de hemoparasitas, que consistiu num teste de Imunofluorescência Indirecta (IFI) para pesquisa de *Ehrlichia* spp. (MegaFLUO® EHRlichia *canis* – Diagnostik Megacor), *Rickettsia* spp. (MegaFLUO RICKETTSIA, Diagnostik Megacor) *Babesia* spp. (MegaFLUO® BABESIA *canis*, Diagnostik Megacor) e *Leishmania* spp. (MegaScreen FluoLeish, Diagnostik Megacor).



**Figura 6** – Diferentes testes serológicos efectuados e respectiva frequência.

## II – Pesquisa de micoplasmas hemotrópicos em gatos errantes da Ilha de Faro

### 1– Introdução teórica

#### 1.1 – Abordagem histórica e nomenclatura

Os organismos aderidos à superfície de eritrócitos felinos foram primeiro identificados por Clark, na África do Sul, em 1942, num gato anémico, sendo denominados por *Eperythrozoon felis* (Small & Ristic, 1971; Sykes, 2010). Aproximadamente 10 anos mais tarde, organismos similares foram reconhecidos em gatos no Colorado, nos Estados Unidos da América (EUA) (Flint & Moss, 1953). Em 1956, com base na sua morfologia, foi sugerida a designação de *Haemobartonella felis* (Flint & McKelvie, 1956). A infecção foi, entretanto, sendo identificada em gatos de outros estados americanos (Balazs *et al.*, 1961; Small & Ristic, 1971) e noutros países nomeadamente Reino Unido e Austrália (Seamer & Douglas, 1959; Harbutt, 1963). Com o aparecimento e desenvolvimento das técnicas de Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês “Polymerase Chain Reaction”) nos anos 90, tornou-se possível a sua detecção molecular. Mais tarde, a análise da sequência do gene da subunidade 16S do Ácido Ribonucleico Ribossómico (rRNA, do inglês “Ribossomal Ribonucleic Acid”) (16S *rRNA*) revelou existir grande semelhança e proximidade genética entre estes organismos e os micoplasmas, tendo *Haemobartonella felis* sido redesignada por *Mycoplasma haemofelis* (Mhf) (Neimark *et al.*, 2001; Neimark *et al.*, 2002). Por volta da mesma altura, outro organismo eperitrocítico foi detectado na Califórnia num gato com infecção pelo Vírus da Leucemia Felina (FeLV, do inglês “Feline Leukemia Virus”). Este organismo tinha, aproximadamente, metade do tamanho de *Mycoplasma haemofelis* e era muito menos patogénico. Inicialmente referido como a forma pequena ou variante da Califórnia de *Haemobartonella felis*, tomou depois a designação de “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” (CMhm) (Foley *et al.*, 2001; Sykes, 2010). Três anos mais tarde, um terceiro micoplasma – “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” (CMt) foi identificado e caracterizado na Suíça, num gato com anemia hemolítica grave (Willi *et al.*, 2005) e, posteriormente, noutras regiões do

mundo como a Austrália, África do Sul e Reino Unido (Willi *et al.*, 2006a). Este foi descoberto com recurso à técnica de PCR e nunca havia sido identificado em esfregaços sanguíneos (Sykes, 2010). Num estudo efectuado nos EUA, foi referido um outro agente hemotrópico que pode infectar o gato, similar aos hemoplasmas caninos, que foi denominado “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*” (CMhp) (Sykes *et al.*, 2005). A informação sobre a importância deste agente em gatos é, ainda, escassa, encontrando-se documentado em poucos artigos (Sykes *et al.*, 2007; Martinez-diaz *et al.*, 2013). Assim, na presente dissertação, serão consideradas apenas três espécies de micoplasmas que infectam o gato: *Mycoplasma haemofelis*, “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” e “*Candidatus Mycoplasma turicensis*”. Na tabela 1 apresenta-se um resumo com as principais características distintivas de cada uma das três espécies consideradas.



**Tabela 1** – Comparação entre as diferentes espécies de micoplasmas hemotrópicos felinos (Messick & Harvey, 2011).

	<i>Mycoplasma haemofelis</i>	“ <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ”	“ <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> ”
<b>Sinónimos</b>	Variante grande, estirpe de <i>Haemobartonella felis</i> Ohio, estirpe da Flórida, estirpe de Oklahoma, estirpe do Illinois.	Variante pequena de <i>Haemobartonella felis</i> , estirpe da Califórnia, estirpe de Birmingham.	Variante da Suíça e estirpe de Zurique.
<b>Achados morfológicos</b>	Comum em esfregaços sanguíneos. Forma cocóide em zonas de multicamada e forma de anel ou bastonete em zonas de monocamada.	Rara em esfregaços sanguíneos. Cora levemente. Bastonetes de pequenas dimensões, com forma cocóide ou, raramente, de anel.	Não observados. Apenas identificados por caracterização molecular.
<b>Sinais clínicos</b>	Depressão, febre, anemia, desidratação, hepatoesplenomegália, linfadenomegália, icterícia, dispneia.	Quase inexistentes ou ausentes: a anemia mais grave pode estar associada a outros factores.	Anemia moderada a grave em gatos infectados experimentalmente. Em gatos naturalmente infectados estão envolvidos vários factores.

A designação de *Candidatus* para três dos hemoplasmas felinos reflecte a sua classificação provisória na nomenclatura bacteriana, devido ao facto de a sua caracterização, especialmente fenotípica, não ser possível em virtude da impossibilidade de cultura *in vitro* destes agentes. *Mycoplasma haemofelis* não tem este estatuto, apesar de também não ser cultivável *in vitro*, pois representa o novo nome de uma espécie que já existia (*Haemobartonella felis*) e, de acordo com as regras da nomenclatura, a denominação de *Candidatus* não pode ser atribuída retrospectivamente (Tasker, 2010).

## 1.2 – Etiologia e Filogenia

Os micoplasmas hemotrópicos ou hemoplasmas são bactérias eperitrocíticas por infectarem eritrócitos, aderindo à sua superfície (Tasker, 2010). Estas não são cultiváveis *in vitro*, são pleomórficas e podem causar anemia hemolítica mais ou menos grave. Estas bactérias infectam uma grande variedade de mamíferos e encontram-se distribuídas mundialmente. Estes agentes, anteriormente, designados por *Haemobartonella felis*, de acordo com a terminologia adoptada por autores americanos e canadianos ou *Eperythrozoon felis*, designação apoiada por ingleses e europeus, são os causadores da Anemia Infecciosa Felina (Small & Ristic, 1971).

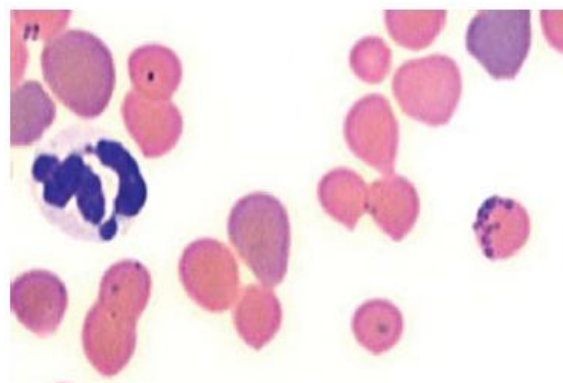
Do ponto de vista taxonómico, trata-se de um microorganismo incluído no grupo das riquetsias, ordem Rickettsiales, família Anaplasmataceae (Neimark *et al.*, 2001; Willi *et al.*, 2007b; Tasker, 2010). Devido ao parasitismo obrigatório dos eritrócitos, coloração gram-negativa, reduzidas dimensões e suspeita de transmissão por vectores artrópodes, à análise da sequência dos genes da porção 16S *rRNA* de *Haemobartonella* spp. e a dados filogenéticos, estes agentes foram colocados num grupo de micoplasmas de crescimento fastidioso (Neimark *et al.*; 2001; Sykes, 2010). Estas espécies são mais aparentadas com a família Mycoplasmataceae, relação que é suportada por algumas características fenotípicas dos micoplasmas hemotrópicos, como o genoma e tamanho reduzidos, o crescimento fastidioso e a ausência de parede celular e flagelos. Apresentam, ainda, resistência às penicilinas e susceptibilidade às tetraciclina (Willi *et al.*, 2007b; Tasker, 2010). Desta análise filogenética resultou a inclusão destes agentes infecciosos num único *cluster*, próximo do grupo de *Mycoplasma pneumoniae*, agrupando os agentes em dois clados distintos, um contendo “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” e espécies relacionadas e o outro *Mycoplasma haemofelis*, “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” e *Mycoplasma haemocanis* (Neimark *et al.*, 2001; Tasker *et al.*, 2003a; Peters *et al.*, 2008). Para além da análise filogenética já referida, outros estudos sugerem, como método alternativo, a análise do gene da ribonuclease P (RNase P) e outros marcadores não ribossómicos como auxílio à construção de árvores filogenéticas em conjunto com os dados do RNA ribossómico. Os resultados obtidos coincidem com o anteriormente descrito, apesar de algumas pequenas diferenças (Tasker *et al.*, 2003; Peters *et al.*, 2008; Hicks *et al.*, 2014a).

Alguns autores estão contra a classificação dos hemoplasmas e sua inclusão no Género *Mycoplasma*, defendendo, não só que demonstram uma similaridade filogenética relativamente reduzida com bactérias deste grupo, como não têm em conta a grande diferença nas características biológicas entre ambos os grupos (Uilenberg *et al.*, 2004). Assim, os micoplasmas são considerados, tipicamente, como bactérias que colonizam e se multiplicam nas membranas mucosas dos hospedeiros, nomeadamente tractos respiratório e urogenital com rara penetração na submucosa ou sangue, (Razin *et al.*, 1998) ao passo que os hemoplasmas têm as características já mencionadas.

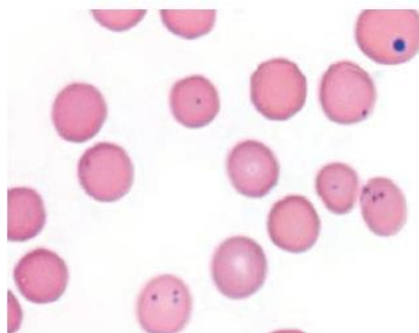
### 1.3 – Morfologia

Os micoplasmas hemotrópicos são organismos que, quando observados ao microscópio óptico, em esfregaços sanguíneos corados, podem aparecer com um formato de coco, bastonete, ser esféricos ou em forma de anel, podendo encontrar-se, nos glóbulos vermelhos, individualmente ou em cadeias (Messick & Harvey, 2011). Maede *et al.* (1975) referiram no seu estudo a presença de organismos predominantemente discóides, alguns deles em forma de cocos ou de anel, corados de roxo ou violeta claro, correspondendo ao que anteriormente era designado como *Haemobartonella felis*, presumivelmente a variante de maiores dimensões, actualmente denominado de *Mycoplasma haemofelis*.

“*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” é estruturalmente semelhante a *Mycoplasma haemofelis*, apesar de ser de menores dimensões que este e de a sua observação por microscopia óptica apresentar resultados discrepantes (Messick & Harvey, 2011; Willi *et al.*, 2011). Nas figuras 7 e 8 observam-se eritrócitos infectados, respectivamente, por *Mycoplasma haemofelis* e “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”.



**Figura 7** – *Mycoplasma haemofelis* no esfregaço sanguíneo de um gato infectado, com anemia regenerativa, observando-se a forma de anel, cocóide e em bastonete (Messick & Harvey, 2011).



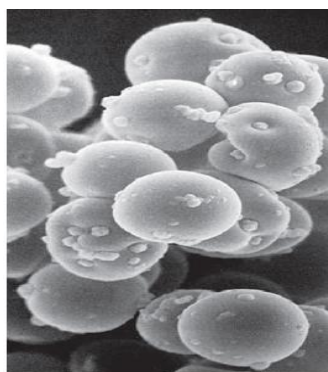
**Figura 8** – “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” no esfregaço sanguíneo de um gato infectado, com formas cocóides, e anemia moderada com ausência de regeneração (Messick & Harvey, 2011).

Independentemente do método de preparação utilizado não foi possível identificar “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” através da observação de esfregaços sanguíneos (Willi *et al.*, 2011). Na opinião dos mesmos autores, tal resultado pode dever-se à reduzida carga dos agentes no sangue durante a infecção.

Mais à frente, serão abordadas, com maior detalhe, as características dos organismos quando observados ao microscópio óptico, no capítulo denominado de diagnóstico citológico.

A morfologia ultraestrutural (observada no microscópio electrónico de transmissão e de varrimento) dos vários hemoplasmas foi descrita por vários grupos. No seu conjunto, os achados mostram uma grande similaridade ultraestrutural entre agentes micoplásmicos eritrocitários.

Genericamente, os organismos infectantes apresentam-se redondos a alongados, com 0.3 a 3  $\mu\text{m}$  de diâmetro (figura 9), envolvidos por uma única membrana a delimitá-los.



**Figura 9** – Fotomicrografia de microscopia electrónica de eritrócitos de um gato infectado com *Mycoplasma haemofelis* (Messick & Harvey, 2011).

Apesar de não terem núcleo, verifica-se a presença de pequenos grânulos e algumas estruturas filamentosas no seu citoplasma. As bactérias aderem mas não penetram na superfície das hemácias. São encontradas em invaginações e depressões profundas da superfície, com uma região livre de 15 a 25 nanómetros (nm) a separar a bactéria da membrana do glóbulo vermelho. Fibrilas delicadas do organismo estendem-se através desta zona livre, permitindo a adesão do organismo à célula hospedeira (Messick, 2004). Nos estudos anteriormente referidos, os organismos referem-se à espécie *Mycoplasma haemofelis*. “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” apresenta uma ultraestrutura similar a outros *Mollicutes*, uma dimensão de aproximadamente 0,3  $\mu\text{m}$ , correspondendo a metade do tamanho de *Mycoplasma haemofelis*. Possui uma membrana plasmática a delimitar mas não tem parede celular ou outras estruturas membranares internas (Foley *et al.*, 2001; Messick & Harvey, 2011). “*Candidatus Mycoplasma turicensis*”, ultraestruturalmente, é similar aos outros hemoplasmas já descritos, embora exiba um diâmetro ligeiramente inferior ao de *Mycoplasma*

*haemofelis*, de aproximadamente 0,3  $\mu$ m, mas idêntico ao de “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” (Willi *et al.*, 2011).

## 1.4 – Epidemiologia

Os hemoplasmas felinos encontram-se em animais domésticos e errantes um pouco por todo o mundo, embora o valor da prevalência real da doença causada por estes microorganismos varie geograficamente.

As infecções com hemoplasmas foram, também, detectadas em felinos selvagens no habitat natural e em cativeiro, provenientes de várias regiões do mundo, como a Europa, África e América do Sul, sendo que em vários casos demonstraram ser altamente prevalentes. Foram, ainda, detectadas infecções com mais do que um agente, com a prevalência a ser superior em animais no habitat natural, comparativamente aqueles em cativeiro (Willi *et al.*, 2007c). Os mesmos autores descreveram, ainda, que existem variações geográficas que podem resultar de diferenças climáticas, com os locais mais quentes a aparentarem ter maiores prevalências de hemoplasmas. Tal resultado parece obter-se, também, em gatos domésticos, dando mais força à hipótese da transmissão por vectores artrópodes. O estudo dos hemoplasmas em felinos selvagens, tal como documentado por Willi e colaboradores (2007c), revela-se de extrema importância, porquanto estes podem representar um reservatório para os agentes infecciosos, devido à frequente exposição do gato doméstico a vectores artrópodes hematófagos.

Genericamente, no que diz respeito à distribuição da infecção por micoplasmas hemotrópicos pelo mundo, tem-se que *Mycoplasma haemofelis*, apesar de ser a espécie mais patogénica, é considerada a de menor ou de prevalência intermédia entre as que foram estudadas na presente dissertação. “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” é a espécie identificada com maior prevalência, com maior ocorrência em gatos mais velhos. “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” apresenta um valor de prevalência idêntico, ou ligeiramente superior ou inferior a *Mycoplasma haemofelis*, consoante os estudos e regiões analisadas. Esta espécie tem sido associada, frequentemente, com

outros hemoplasmas, aparecendo em infecções duplas ou triplas, principalmente com “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” (Sykes, 2010; Tasker, 2010). A co-infecção mais comum é aquela que associa *Mycoplasma haemofelis* com “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”. A informação existente sobre a distribuição mundial da espécie “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*” em gatos é, ainda, escassa, embora tenha sido identificada em gatos nos EUA (Sykes *et al.*, 2007) e em Portugal (Martinez-Diaz *et al.*, 2013).

#### 1.4.1 – Hemoplasmose em Portugal

Actualmente, são, ainda, escassos os estudos relativos à prevalência de hemoplasmas em Portugal. Um dos existentes refere-se à prevalência dos micoplasmas hemotrópicos em gatos com proprietário, errantes e de abrigos, das regiões Centro e Norte do País em que os autores obtiveram uma prevalência total para a infecção por hemoplasmas de 43,44% (tabela 2) (Martinez-Diaz *et al.*, 2013). Como hemoplasma mais prevalente os autores encontraram “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”, com uma prevalência total de 61,8%. A prevalência de *Mycoplasma haemofelis* foi de 14,1%. Já a co-infecção com maior prevalência foi a que juntou *Mycoplasma haemofelis* e “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”, com um valor de 23,7%. Por PCR em tempo real, os mesmos autores identificaram a espécie “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*”, a qual apareceu, apenas, em co-infecções com os restantes hemoplasmas, em 6,4% dos casos em infecção dupla com “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”, em 2,2% dos casos em infecção tripla com “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” e *Mycoplasma haemofelis*, em infecção tripla com “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” e “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” em 0,7% dos casos e em infecção quadrúpla com as outras três espécies de hemoplasmas em 0,7%, perfazendo uma percentagem total desta espécie de 4,38%. Quanto à espécie “*Candidatus Mycoplasma turicensis*”, foi encontrada em 1,25% dos gatos. Mais recentemente, Duarte e colaboradores (2014) estudaram a epidemiologia destas espécies bacterianas nas populações de gatos rurais e urbanas das regiões nacionais do Centro e Sul. A detecção e identificação foram efectuadas com recurso à técnica de PCR em tempo real, em animais com proprietário, de abrigo, errantes e dadores de sangue. A prevalência

total de infecção por hemoplasmas foi de 27,1% com as seguintes distribuições por espécie de micoplasma: 7,6% com *Mycoplasma haemofelis*, 10,6% com “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” e 0,8% com “*Candidatus Mycoplasma turicensis*”, todos eles em infecção única. Já no que diz respeito a co-infecção dupla ou tripla os autores encontraram uma prevalência de 8,1%.

Num outro trabalho, que teve como objectivo identificar a prevalência de *Mycoplasma haemofelis* num Hospital Veterinário em Almada, Pais (2013) encontrou, por PCR, uma prevalência deste agente de 20,7%.

Para além destes, foi, ainda, efectuado um estudo, com animais apresentados à consulta num Hospital Veterinário da região de Parede, suspeitos de ter anemia. Foi descrito um valor de 69,7% de animais positivos, através de PCR em tempo real, para a espécie *Mycoplasma haemofelis*, a única a ser avaliada no estudo referido (Vicente, 2015).



**Tabela 2** – Resumo dos estudos epidemiológicos sobre a prevalência de infecção por *Mycoplasma* spp. em Portugal.

Local	Amostra	Animais com diagnóstico positivo	Método de diagnóstico	Referência
<b>Centro e Norte de Portugal</b>	n = 320 Amostras de gatos errantes, de abrigo e com proprietário.	Total: 43,44% (n = 139)  Mhf: 12,81 % (n = 41)  CMhm: 41,56% (n = 133)  CMt: 0,6% (n = 2)  CMhm + CMhp: 6,4% (n = 9)  CMhm + Mhf + CMhp: 2,2% (n = 37)  CMt + CMhp + CMhm: 0,7 % (n = 1)  Mhf + CMhm + CMt + CMhp: 0,7 % (n = 1)  Total em co-infecção: 14,68% (n = 47)	PCR em Tempo Real	(Martinez-Diaz <i>et al.</i> , 2013)
<b>Almada</b>	n = 58 Animais, saudáveis e/ou com doenças várias, apresentados à consulta, internados e submetidos a cirurgia.	Mhf: 20,7 % (n = 12)	PCR convencional	(Pais, 2013)

<b>Centro e Sul de Portugal</b>	n = 236 Gatos com proprietário, errantes e dadores de sangue.	Mhf: 7,6% (n = 18)	PCR em Tempo Real	(Duarte <i>et al.</i> , 2014)
		CMhm: 10,6% (n = 25)		
		CMt: 0,8% (n = 2)		
		Total em co-infecção: 8,1% (n = 19)		
		Mhf + CMhm: 3% (n = 7)		
		CMhm + CMt: 1,3% (n = 3)		
		Mhf + CMt: 0,8% (n = 2)		
<b>Parede</b>	n = 66 Animais com proprietário apresentados à consulta com suspeita de anemia por <i>Mycoplasma haemofelis</i> .	CMhm + Mhf + CMt: 3% (n = 7)	PCR em Tempo Real	(Vicente, 2015)
		Mhf: 69,7% (n = 46)		

---

Mhf – *Mycoplasma haemofelis*, CMhm – “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”, CMt – “*Candidatus Mycoplasma turicensis*”, CMhp – “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*”.

### 1.4.2 – Hemoplasmose no Mundo

As várias espécies de micoplasmas hemotrópicos felinos têm sido descritas em vários países pelo mundo com prevalências diferentes. Estas diferenças podem resultar de variações geográficas como o clima, distribuição de vectores e características da própria população de gatos, principalmente se for tido em conta o facto de as características das amostras serem muito diferentes, com as chamadas amostras de conveniência a serem muito comuns. No geral, foram estudadas amostras com animais saudáveis, animais suspeitos de ter hemoplasmose e/ou outras doenças ou um misto entre ambos. Na literatura encontram-se descritas prevalências de *Mycoplasma* spp. entre 8% e 28 % em várias regiões como o Reino Unido – 18,5% (Tasker *et al.*, 2003b) e 14% (Peters *et al.*, 2008b) –, Itália – 18,9% (Gentilini *et al.*, 2009) –, Grécia – 20,7 % (Maher *et al.*, 2010) –, Austrália – 28% (Tasker *et al.*, 2004) –, EUA – 18% (Sykes *et al.*, 2007) e 20% (Luria *et al.*, 2004) –, Canadá – 14% (Niblett *et al.*, 2009) e 8% (Niblett *et al.*, 2010) – e Japão – 26,4% (Tanahara *et al.*, 2010). Alguns autores descreveram, noutras regiões do mundo, prevalências superiores: 30% em Espanha (Criado-Fornelio *et al.*, 2003), 44,9% na África do Sul (Lobetti & Tasker, 2004), 27,9% na Alemanha (Bauer *et al.*, 2008), 46,7% em Trindade e Tobago (Georges *et al.*, 2012) e 31% na Nova Zelândia (Jenkins *et al.*, 2013).

“*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” é a espécie que, na maioria da literatura consultada, surge com maior frequência, tanto em infecção única como associada a outros hemoplasmas, com excepção de Espanha onde Criado-Fornelio e colaboradores (2003) identificaram uma percentagem de *Mycoplasma haemofelis* (20%, 6/9) superior à de “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” (10%, 3/9), o mesmo tendo sido descrito em animais errantes no Canadá (Kewish *et al.*, 2004; Kamrani *et al.*, 2008).

*Mycoplasma haemofelis* é, de entre as três espécies estudadas, a que aparece com menor prevalência ou com prevalência intermédia, em vários países europeus (Criado-Fornelio *et al.*, 2003; Bauer *et al.*, 2008; Peters *et al.*, 2008b; Gentilini *et al.*, 2009; Maher *et al.*, 2010; Roura *et al.*, 2010; Weingart *et al.*, 2015), na Austrália (Tasker *et al.*, 2004), nos EUA (Sykes *et al.*, 2007), na Nova Zelândia (Jenkins *et al.*, 2013), no Brasil (Braga *et al.*, 2012), no Japão (Tanahara *et al.*, 2010) e em Trindade e Tobago (Georges *et al.*, 2012), com valores de prevalência entre 0,4% e 23%. Todavia,

surge com maior expressão num estudo efectuado no Canadá, onde foi descrita uma prevalência de 46,6% (Kamrani *et al.*, 2008).

A prevalência da infecção por “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” é próxima ou inferior à encontrada para *Mycoplasma haemofelis*, com valores descritos entre 0,4% e 10%, em países como os EUA, Reino Unido, Itália, Espanha, Japão e Brasil (Sykes *et al.*, 2007; Peters *et al.*, 2008b; Gentilini *et al.*, 2009; Roura *et al.*, 2010; Tanahara *et al.*, 2010; Braga *et al.*, 2012). Noutros locais, foram descritas prevalências superiores, nomeadamente na África do Sul, com 26% dos animais infectados com este agente (Willi *et al.*, 2006a). Este organismo micoplásmico, apesar de surgir, com frequência, em infecção única, foi descrito várias vezes em co-infecção com os outros hemoplasmas anteriormente referidos, principalmente com “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” (Willi *et al.*, 2006b; Peters *et al.*, 2008; Gentilini *et al.*, 2009; Roura *et al.*, 2010; Tanahara *et al.*, 2010; Georges *et al.*, 2012; Jenkins *et al.*, 2013). Foram descritas co-infecções duplas, com várias combinações entre as espécies de hemoplasmas anteriormente mencionadas. A co-infecção mais frequente é aquela que junta *Mycoplasma haemofelis* e “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”. Foram, também, descritos vários casos de infecções triplas (Fujihara *et al.*, 2007; Peters *et al.*, 2008b; Tanahara *et al.*, 2010; Georges *et al.*, 2012).

A espécie “*Candidatus Mycoplasma haematoparvum*” foi descrita, apenas num estudo, por Sykes e colaboradores (2007), em 0,7% dos animais estudados.

## **1.5 – Factores de risco**

Os factores de risco associados à infecção por micoplasmas hemotrópicos felinos são a idade, o sexo, o habitat, a infecção pré-existente pelos retrovírus (Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV, do inglês “ Feline Immunodeficiency Virus) e/ou Vírus da Leucemia Felina (FeLV, do inglês “ Feline Leukemia Virus”) e a infecção em simultâneo com diferentes espécies de micoplasmas (Sykes, 2010). Vários autores referiram outros potenciais factores de risco. Um deles é a raça, sendo que animais de raças não definidas ou domésticas, são mais susceptíveis à infecção do que raças puras

(Niblett *et al.*, 2009; Jenkins *et al.*, 2013), embora se tenha verificado o oposto quando em animais FIV positivos (Macieira *et al.*, 2008). O estado reprodutivo pode, também, ser considerado como factor de risco, com os animais inteiros a serem associados a maior propensão para hemoplasmoses (Pais, 2013). A presença/ausência de ectoparasitas, como pulgas e carraças, traduzindo-se numa relação sazonal devido à distribuição dos vectores artrópodes (Gentilini *et al.*, 2009), a presença de anemia (Harrus *et al.*, 2002; Tasker *et al.*, 2003b; Kewish *et al.*, 2004; Jenkins *et al.*, 2013), principalmente em associação com *Mycoplasma haemofelis*, e o estado sanitário ou existência de doenças concomitantes, com os animais doentes a apresentarem maior propensão para micoplasmoses (Tasker *et al.*, 2003b), foram, também, referidos como possíveis factores de risco para hemoplasmoses. Sykes *et al.* (2007) verificaram existir uma relação entre a infecção por “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” e a estomatite e o carcinoma das células escamosas mas, ao contrário do referido por Willi *et al.* (2006b), não identificaram associação significativa com insuficiência renal crónica.

Vários autores demonstraram que gatos com infecção por FeLV têm maior probabilidade de estarem infectados com hemoplasmas (George *et al.*, 2002; Sykes *et al.*, 2007; Bauer *et al.*, 2008; Macieira *et al.*, 2008; Gentilini *et al.*, 2009; Roura *et al.*, 2010; Barker & Tasker, 2013). Sabe-se, também, que a co-infecção com retrovírus pode exacerbar a manifestação clínica de doença e a gravidade da anemia, em animais com Anemia Infecciosa Felina. Desconhece-se, porém, se um gato positivo para retrovírus é mais susceptível a hemoplasmas ou se é o contrário que se verifica (George *et al.*, 2002; Barker & Tasker, 2013). Harrus e colaboradores (2002), num trabalho que pretendia estudar a relação entre hemoplasmoses e retrovírus, em gatos, observaram a existência de uma tendência na associação da infecção por FIV e uma menor sobrevivência, mas tal não se verificou para infecção por FeLV.

No Brasil, a infecção com retrovírus foi associada primariamente à infecção por “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”, sendo a associação especialmente forte no caso de infecção por FIV (Macieira *et al.*, 2008). O mesmo foi, também, descrito por vários autores, não necessariamente só com “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” (Sykes *et al.*, 2007; Gentilini *et al.*, 2009; Roura *et al.*, 2010; Georges *et al.*, 2012; Jenkins *et al.*, 2013; Martinez-diaz *et al.*, 2013). Na Alemanha foi detectada uma

associação com a infecção por FeLV. Foram, também, reconhecidas co-infecções com “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”, “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” e *Mycoplasma haemofelis* (Bauer *et al.*, 2008). Num estudo realizado em Portugal, a infecção múltipla com “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” e “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” foi identificada em animais doentes, sendo que a grande detecção destas espécies em gatos mais velhos pode estar relacionada com a existência de patologia concomitante e estatisticamente associada com animais errantes, machos e positivos para FIV (Duarte *et al.*, 2014). De acordo com estes autores, os animais com FIV tinham maiores taxas de infecção por “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”, enquanto os animais positivos para FeLV tinham maiores taxas de infecção por *Mycoplasma haemofelis*, embora ambos sem uma associação estatisticamente significativa.

Séverine Tasker (2010) defende que os gatos machos sem pedigree e mais velhos apresentam um risco aumentado de infecção por hemoplasmas, apesar de os mais novos demonstrarem, com maior frequência, doença clínica associada a *Mycoplasma haemofelis*; os mais velhos apresentam, normalmente, doença clínica em resultado de infecção por “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” ou “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” (Tasker *et al.*, 2003b; Tasker *et al.*, 2004; Sykes *et al.*, 2007; Jenkins *et al.*, 2013). Animais com acesso total ou parcial ao exterior são mais propensos à infecção por hemoplasmas de acordo com alguns autores (Sykes *et al.*, 2007; Roura *et al.*, 2010; Duarte *et al.*, 2014), mas não outros (Macieira *et al.*, 2008; Niblett *et al.*, 2009; Niblett *et al.*, 2010; Martinez-diaz *et al.*, 2013; Pais, 2013). Embora nem sempre se verifique uma associação entre hemoplasmoses e os gatos machos (Sykes *et al.*, 2007; Macieira *et al.*, 2008; Gentilini *et al.*, 2009; Niblett *et al.*, 2009; Maher *et al.*, 2010; Georges *et al.*, 2012; Martinez-diaz *et al.*, 2013; Pais, 2013), normalmente existe uma maior prevalência da doença nos machos, possivelmente derivado do seu estilo de vida mais livre e comportamento agressivo (Duarte *et al.*, 2014).

## 1.6 – Vias de transmissão

### 1.6.1 – Transmissão por vectores artrópodes

O modo de transmissão dos hemoplasmas felinos sempre foi um enigma, não estando, ainda, muito bem definido. Suspeita-se que as pulgas funcionem como vector e possam transmitir *Mycoplasma haemofelis*, embora o agente subsista em locais onde a infestação por pulgas é pouco comum. Em pulgas retiradas de gatos tem sido encontrado DNA micoplásmico, mas tal seria de esperar dado o seu carácter hematófago (Sykes, 2010). Alguns autores realizaram tentativas de transmissão experimental de micoplasmas a gatos através de pulgas (Woods *et al.*, 2005; Woods *et al.*, 2006), sem que os resultados tenham sido conclusivos, uma vez que apenas um de seis gatos inoculados desenvolveu um resultado positivo, por PCR. Todavia, estes trabalhos são importantes tendo em conta a necessidade de desencadear novas investigações sobre o tema e, caso a hipótese venha a ser confirmada, apoiar as recomendações para um adequado controlo de pulgas em gatos (Sykes, 2010). Além disso, foi levantada a hipótese de a transmissão de *Mycoplasma* spp. através de *Ctenocephalides felis* ocorrer, não pela actividade hematófaga das pulgas, mas pela ingestão de pulgas infectadas e seus produtos derivados. Todavia, esta hipótese não foi demonstrada, de acordo com o estudo efectuado por Woods e colaboradores (2006), daqui resultando a conclusão que a ingestão de pulgas infectadas não deve ser uma via de transmissão de hemoplasmas importante e que estes ectoparasitas poderão ser relevantes, essencialmente, como agentes de transmissão mecânica. Na Europa, *Mycoplasma haemofelis* foi detectado, por PCR, em carraças da espécie *Ixodes ricinus* (Willi *et al.*, 2007b). No Japão, Taroura e colaboradores (2005), também por PCR, detectaram “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” em carraças da espécie *Ixodes ovatus*, não alimentadas, sugerindo a existência de transmissão transtadial nesta espécie de carraça (Willi *et al.*, 2007b). Contudo, na Suíça, estudos moleculares examinando, aproximadamente, 2000 carraças não alimentadas do género *Ixodes*, não demonstraram evidência da presença de DNA de hemoplasma, tendo as infecções sido descritas em áreas suburbanas onde a exposição a carraças é mínima, podendo levar à conclusão que estes ectoparasitas podem ter, apenas, um papel marginal enquanto reservatórios e vectores na transmissão de hemoplasmas (Willi *et al.*, 2007a; Sykes, 2010). Verifica-se que ocorre variação geográfica na prevalência de infecção por

micoplasmas, o que suporta a tese de transmissão por vectores artrópodes. Foi sugerido que os mosquitos possam ter um papel na transmissão, embora um estudo com mosquitos, no Colorado, apenas tenha revelado a presença de DNA de *Mycoplasma wenyonii*, um hemoplasma bovino (Sykes, 2010).

### 1.6.2 – Transmissão horizontal

A grande predilecção pelo sexo masculino e a associação com infecção retroviral, levantaram a hipótese de transmissão directa através de actividades de luta e mordeduras. A Anemia Infecciosa Felina foi detectada em animais sobre os quais foram documentadas semanas de actividades de luta e mordeduras. Foi, também, descrita uma associação com abscessos por mordedura, em gatos, apesar de ser possível que represente reactivação da infecção após o stress da luta ou mordedura. Os hemoplasmas foram detectados na saliva e fezes de gatos infectados. Foram, também, detectados hemoplasmas na saliva e gengiva de gatos naturalmente infectados (Dean *et al.*, 2008). Neste último estudo, foi feita a colheita da saliva com zaragatoas sublinguais e nas bochechas, tendo sido detectados hemoplasmas, ainda que em níveis muito baixos. *Mycoplasma haemofelis* não foi detectado na saliva, em nenhum dos gatos positivos para este agente. Foram, ainda, obtidas glândulas salivares por necrópsia, de cinco gatos com “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” e três gatos com *Mycoplasma haemofelis*, tendo “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” sido detectado em duas das cinco amostras de glândulas salivares de gatos infectados com esta espécie; não foram detectados hemoplasmas nas amostras colhidas dos animais infectados com *Mycoplasma haemofelis* (Dean *et al.*, 2008). Os resultados obtidos, nomeadamente no que se refere a “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”, suportam a hipótese de a saliva poder actuar como uma via de transmissão deste agente, tal como postulado para “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” (Willi *et al.*, 2006a). Todavia, apesar dos resultados anteriormente referidos, o único método para confirmação desta hipótese é a transmissão experimental de infecção por “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”, através da saliva (Dean *et al.*, 2008).

Os gatos também podem ficar infectados através da ingestão de aproximadamente 5 mililitros (mL) de sangue infectado. Assim, é possível que o animal



mordido ou que mordeu fique infectado após as actividades de agressão (Sykes, 2010). Todavia, as tentativas para infectar gatos através de inoculação subcutânea de saliva contaminada com “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” e inoculação oral e oronasal com 500 microlitros (µL) de sangue infectado com “*Candidatus Mycoplasma turicensis*”, não foram bem-sucedidas. Em contraste, a inoculação subcutânea com 10 µL de sangue infectado com “*Candidatus Mycoplasma turicensis*”, levou à transmissão bem-sucedida do organismo (Museaux *et al.*, 2009; Sykes, 2010).

### **1.6.3 – Transmissão interespecífica**

Devido à estreita relação filogenética entre os hemoplasmas felinos, caninos e de roedores, foi feita investigação no sentido de determinar a possibilidade de transmissão interespecífica de vários agentes. Um estudo experimental referiu que a inoculação de hemoplasmas felinos, em cães esplenectomizados, não resultou em bacteriémia detectável e gatos inoculados com sangue de cães infectados com hemoplasmas caninos, permaneceram assintomáticos. Contudo, quando o sangue destes últimos foi inoculado nos cães esplenectomizados, estes desenvolveram bacteriémia, sugerindo que os gatos podem actuar como portadores de hemoplasmas caninos (Willi *et al.*, 2007b). Devido ao facto de se ter descoberto, através de análise filogenética do gene *16S rRNA*, uma relação próxima entre *Mycoplasma coccoides* (hemoplasma responsável por induzir anemia hemolítica em roedores) e “*Candidatus Mycoplasma turicensis*”, surgiu a hipótese de ter ocorrido transmissão interespecífica deste último agente infeccioso, do rato para o gato, através da caça (Willi *et al.*, 2005), especialmente tendo em conta que, de acordo com a evidência de um estudo na Suíça, os roedores selvagens são hospedeiros naturais de *Mycoplasma coccoides* e as infecções com este agente são comuns nalgumas espécies de roedores (Willi *et al.*, 2007a). Contudo, até à data, as espécies de hemoplasmas felinos não foram encontradas na população de roedores (Sykes, 2010).

#### 1.6.4 – Transmissão iatrogénica por transfusão sanguínea

A transmissão de micoplasmose hemotrópica pode ocorrer depois de transfusão sanguínea, principalmente quando se trata de sangue fresco contaminado. Num estudo efectuado com sangue colhido para tubo com Solução Anticoagulante de Citrato de Adenina-Dextrose-Fosfato (CPDA-1, do inglês “Anticoagulant Citrate Phosphate Dextrose Adenine Solution”), durante diferentes períodos de tempo, foi observada transmissão de *Mycoplasma haemofelis* e “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” a gatos *naïve* (gatos previamente negativos), através da administração de sangue infectado com hemoplasmas. Esta foi avaliada através de técnicas moleculares de PCR convencional e em tempo real. O estudo permitiu concluir que, apesar de o risco de transmissão de hemoplasmas diminuir com o armazenamento prolongado no meio CPDA-1, o armazenamento por curtos períodos de tempo parece não diminuir a transmissibilidade dos hemoplasmas no sangue infectado. Além disso, como as transfusões sanguíneas são, normalmente, efectuadas em animais doentes anémicos, a quantidade de sangue a transfundir é superior à utilizada no estudo, sendo maior a quantidade de potenciais organismos infectantes e, como tal, que podem permanecer viáveis durante mais tempo. A tudo isto acresce o facto de os animais a receberem transfusões se encontrarem, normalmente, bastante doentes e, frequentemente, afectados por doenças que provocam algum grau de imunossupressão, ficando o seu sistema imunitário mais frágil e menos apto a lidar com microorganismos invasores (Gary *et al.*, 2006). Os gatos, potenciais dadores de sangue, devem ser sempre testados, por PCR, para a infecção com *Mycoplasma haemofelis*, excluindo-se os dadores com resultado positivo. A importância de testes positivos no caso das outras duas espécies de hemoplasmas é menos evidente (Sykes, 2010).

Por tudo o que já foi referido e, de acordo com o Colégio Americano de Medicina Interna Veterinária (ACVIM, do inglês “American College of Veterinary Internal Medicine”), para o caso específico desta doença que se pensa ser transmitida por vectores, é recomendado que os futuros dadores de sangue sejam sujeitos a rastreio de infecção, recorrendo-se à técnica de PCR, podendo esta ser ou não acompanhada de observação de esfregaços sanguíneos, embora esta última seja uma técnica de reduzida sensibilidade (Wardrop *et al.*, 2005; Barfield & Adamantos, 2011).

### **1.6.5 – Outras vias de transmissão**

Alguns autores sugeriram que possa ocorrer a transmissão vertical de hemoplasmas das gatas para as crias durante a gestação, o parto ou a lactação, embora ainda não existam dados que suportem esta conclusão (Willi *et al.*, 2007b; Tasker, 2010). Além disso, e apesar de não ter sido referida, existe a hipótese de a transmissão de hemoplasmose ser possível através do uso inapropriado do mesmo equipamento em diferentes gatos sem que tenham sido submetidos a uma limpeza ou esterilização adequada, particularmente se a contaminação do sangue foi significativa e o tempo passado entre procedimentos consecutivos reduzido (Tasker, 2010).

## **1.7 – Patogenia**

### **1.7.1 – Mecanismos de patogenicidade**

São vários os mecanismos que foram propostos para explicar a patogenia dos micoplasmas. Entre eles, destacam-se a produção de radicais livres pelos micoplasmas que produzem peróxido de hidrogénio, que vai induzir danos nas membranas celulares do hospedeiro, com um efeito tóxico potencial directo nos eritrócitos infectados (Barker *et al.*, 2011) com consequente stress oxidativo e diminuição de tempo de vida das células (Santos *et al.*, 2011). Pensa-se que possa ocorrer eriptose, segundo um estudo efectuado com um hemoplasma suíno. Trata-se de um processo de morte programada dos eritrócitos que se caracteriza pela formação de microvesículas, activação de proteases, diminuição das dimensões e volume das células e exposição da membrana, permitindo assim a fagocitose (Felder *et al.*, 2011). Outros mecanismos referidos são a secreção de enzimas micoplásmicas que levam à destruição tecidular localizada, nomeadamente resultante da clivagem de proteínas de membrana nos eritrócitos (Messick, 2004), a existência de factores de virulência como toxinas, citolisinas e invasinas que permitem o estabelecimento da infecção (Santos *et al.*, 2011), as aberrações cromossómicas e, ainda, a depleção de nutrientes ou precursores de biossíntese por parte dos micoplasmas, com consequente dano celular (Messick, 2004).

A patogenia da hemoplasmosse felina pode ser dividida em várias fases: i) a incubação do agente ou fase pré-bacteriémica, ii) a fase aguda ou de bacteriémia aguda, iii) a fase de recuperação e iv) a fase de portador. A fase pré-bacteriémica ou de incubação ocorre, normalmente, uma a três semanas após o primeiro contacto com o agente infectante e decorre desde que se verifica este contacto até que aparecem os primeiros sinais clínicos. A fase de bacteriémia aguda desenvolve-se semanas a meses após ter ocorrido a infecção e representa o período que medeia o primeiro pico e o último pico de maior bacteriémia. Esta ocorre quando os gatos se encontram sob algum grau de stress, e resulta numa anemia moderada a grave. Caracteriza-se por uma bacteriémia cíclica com uma duração de semanas a meses, excepto se ocorrer morte do animal devido a bacteriémia massiva e se ocorrer descida abrupta dos níveis de hematócrito (HCT) cedo no decorrer da doença (Giger, 2005; Messick & Harvey, 2011).

Os gatos são capazes de montar uma resposta imunitária à infecção com correspondente aumento do hematócrito e o desaparecimento dos organismos dos esfregaços sanguíneos. Nesse sentido, foi sugerido que gatos em recuperação, com duração de pelo menos um mês (fase que vai desde o pico de maior bacteriémia até à estabilização do HCT para valores dentro dos limites de referência ou próximo destes) (Messick & Harvey, 2011), podem manter-se portadores subclínicos durante anos, com o organismo a ser capaz de evadir o sistema imunitário. Esta situação pode resultar numa possível reactivação da doença por stress, gestação, infecção concomitante, ou neoplasia. Todavia, os estudos efectuados com vista a reproduzir a reactivação da doença experimental através de criação de abscessos, administração de glucocorticóides e ciclofosfamida e a esplenectomia não foram bem-sucedidos (Sykes, 2010). Esta é a fase denominada de fase de portador.

Segundo Séverine Tasker (2010), o estado de portador de longa duração aparenta ser especialmente comum após infecção com “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”, embora tenha sido mencionada por Willi e colaboradores (2006b) uma suspeita de eliminação desta infecção, com e sem recurso a terapêutica antimicrobiana.

No caso da espécie *Mycoplasma haemofelis*, o seu resultado positivo na PCR está, normalmente, associado à presença de anemia em gatos (Sykes, 2010). Gatos infectados com este hemoplasma podem resolver espontaneamente a infecção sem recurso a antibioterapia, o que também foi referido para a espécie “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” (Tasker, 2010).

Os eritrócitos afectados durante a infecção perdem a sua capacidade de deformação, desencadeando uma resposta imunitária sendo, consequentemente, rapidamente sequestrados e fagocitados, principalmente nas células reticulares e nos macrófagos do baço (Maede, 1978; Maede & Murata, 1978) e noutros tecidos como o pulmão e o fígado (Maede & Hata, 1975). Num estudo com *Mycoplasma haemofelis*, não foi comprovado o sequestro dos organismos infectantes nos vários locais estudados (Tasker *et al.*, 2009b.). No que se refere a “*Candidatus Mycoplasma turicensis*”, verifica-se precisamente o oposto, com o agente infectante a ser alvo de sequestro em grande número e na totalidade dos tecidos avaliados, com níveis mais elevados na tiróide, glândula salivar parótida e aorta, persistindo aí mesmo após término da bacteriemia (Novacco *et al.*, 2013). Relativamente a “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”, os valores encontrados foram inferiores aos descritos para gatos infectados de forma aguda com *Mycoplasma haemofelis* em níveis moderados ou elevados, e superior aos obtidos em gatos infectados cronicamente com esta última espécie e com reduzidos níveis do agente infectante no sangue, tendo sido detectados organismos sequestrados no baço, pulmão, fígado, coração e aorta (Wolf-Jackel *et al.*, 2012). Os eritrócitos sequestrados podem desencadear libertação dos microorganismos que, assim, reentram na circulação sanguínea. O estado portador, que foi já referido, ocorre em virtude de os microorganismos ficarem armazenados nos macrófagos nos locais de sequestro (Giger, 2005).

Declínios acentuados no hematócrito correlacionam-se, frequentemente, com o aparecimento dos organismos e sua observação nos esfregaços sanguíneos (Sykes, 2010). Assim, e de acordo com o referido no estudo de Maede & Hata (1975), os valores de hemoglobina, HCT e glóbulos vermelhos, mostraram aumentos e diminuições repetidos de acordo com o aparecimento ou desaparecimento dos micoplasmas dos eritrócitos infectados. Estes autores demonstraram existir um aumento de fragilidade osmótica decorrente do dano celular provocado nos eritrócitos e que não

retoma a valores iniciais, mesmo após o desaparecimento do agente dos glóbulos vermelhos. Noutro estudo, Maede (1975), correlacionou a fragilidade osmótica com a diminuição do tempo de vida útil de hemácias infectadas, principalmente aquelas com danos acentuados e irreversíveis na sua membrana, provocados pelo agente infectante e que acabam por ser destruídas. Esta fragilidade resulta de uma diminuição da concentração de lípidos na membrana eritrocitária, diminuindo ambas de forma mais acentuada à medida que a anemia se torna mais grave. O tamanho médio dos eritrócitos reduz-se à medida que progride a anemia, enquanto ocorre um aumento aquando da remissão desta (Maede, 1980).

Crê-se que a maior parte da anemia provocada por micoplasmas hemotrópicos seja extravascular. A hemólise intravascular também foi descrita num caso, na Suíça, de “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” (Willi *et al.*, 2005) e, mais recentemente, noutro na Alemanha (Weingart *et al.*, 2015). A anemia, resultante da infecção por estes agentes, pode, também, ter uma componente imunomediada associada, responsável pela destruição eritrocitária, hipótese esta suportada pela detecção de complexos eritrócito-anticorpo reactivos em gatos infectados (Sykes, 2010), assim como por resultados positivos em testes de Coombs e autoaglutinação em gatos anémicos com *Mycoplasma haemofelis* (Tasker *et al.*, 2009a). Alguns autores detectaram anticorpos apenas em gatos infectados com *Mycoplasma haemofelis* e não “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” ou “*Candidatus Mycoplasma turicensis*”, suportando a ideia de que o *Mycoplasma haemofelis* é o agente de maior patogenicidade (Sykes, 2010; Messick & Harvey, 2011).

### **1.7.2 – Diferenças de patogenicidade e imunidade entre as diferentes espécies de hemoplasma**

A espécie *Mycoplasma haemofelis* é a mais patogénica das três estudadas, tal como já anteriormente referido. Infecção aguda provocada por este agente resulta, frequentemente, numa anemia hemolítica grave, especialmente em gatos mais novos. Nalguns casos, porém, só se verifica anemia moderada. Os gatos não necessitam de estar imunocomprometidos ou esplenectomizados para que se observe doença clínica causada por *Mycoplasma haemofelis*, ao contrário do que acontece em cães. Este

procedimento tem um efeito variável no decorrer da infecção por hemoplasmas em gatos. A reactivação da doença com anemia e bacteriémia detectável citologicamente foi detectada em alguns animais cronicamente infectados, apesar de outros estudos sugerirem que a esplenectomia aumenta o número de organismos visíveis nos esfregaços sanguíneos sem, no entanto, causar anemia significativa. A infecção em gatos esplenectomizados com “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” não parece potenciar a patogenicidade dos organismos (Sykes, 2010). Maede (1978) observou que a remoção de *Mycoplasma haemofelis* é mais lenta em gatos esplenectomizados do que em gatos não esplenectomizados. Porém, quando esta é efectuada antes de a infecção ocorrer, não parece ter efeito no período de incubação e gravidade da doença desenvolvida. No caso de animais que já recuperaram, a cirurgia de remoção de baço resulta num reaparecimento transitório dos organismos no sangue (Maede, 1978; Messick & Harvey, 2011).

De acordo com Hicks e colaboradores (2014b), verifica-se protecção contra reinfeção, após recuperação, no caso de infecção provocada por *Mycoplasma haemofelis*, sendo que esta protecção vem associada a alterações imunológicas.

Não foi observada protecção cruzada contra *Mycoplasma haemofelis* em gatos que haviam recuperado de infecção por “*Candidatus Mycoplasma turicensis*”. Estes animais exibiam um estabelecimento mais rápido de infecção, ficando positivos na PCR e anémicos, significativamente mais cedo do que aqueles que eram expostos ao agente patogénico pela primeira vez (Baumann *et al.*, 2015).

Infecções com “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” ou “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” podem causar diminuições nos parâmetros eritrocitários, apesar de a anemia clínica não ser, normalmente, induzida, excepto em animais com afecções concomitantes ou imunossupressão (Barker & Tasker, 2013). Existem, porém, casos de anemia primária atribuída a infecção por estes agentes (de Lorimier & Messick, 2004; Willi *et al.*, 2005; Reynolds & Lappin, 2007; Hornok *et al.*, 2008). “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” foi associado com o desenvolvimento de doença mieloproliferativa em gatos com FeLV (Barker & Tasker, 2013), como evidenciado por Sykes e colaboradores (2007), com gatos infectados naturalmente e que apresentaram resposta regenerativa da medula óssea diminuída (Sykes *et al.*, 2007) e por George e

colaboradores (2002) com gatos com FIV e/ou FeLV que apresentaram anomalias hematológicas características de doenças mieloproliferativas.

“*Candidatus Mycoplasma turicensis*” encontra-se normalmente em co-infecção com outros hemoplasmas, tornando difícil avaliar a sua patogenia (Barker & Tasker, 2013), como evidenciado por Willi *et al.* (2006b) e Peters *et al.* (2008b). Vários autores demonstraram que os níveis deste hemoplasma no sangue não flutuam muito, ocorrendo decréscimo dos mesmos antes de tal acontecer com *Mycoplasma haemofelis* (Willi *et al.*, 2005; Museaux *et al.*, 2009). Novacco e colaboradores (2011), que foram os primeiros a investigar a fase crónica de uma infecção experimental com esta espécie bacteriana, detectaram o agente mencionado em vários tecidos, na ausência de bacteriemia detectável por PCR, assim como persistência de anticorpos em níveis elevados até vários meses após exposição. Além disso, a tentativa de imunossupressão não resultou numa reactivação da infecção pelo agente supracitado. Por estes motivos, este não parece ser uma grande fonte de infecção com hemoplasmas em gatos.

Os mesmos autores observaram protecção imunológica em casos de animais infectados que tinham recuperado de bacteriemia provocada por “*Candidatus Mycoplasma turicensis*”, em situações experimentais controladas, tendo, ainda, avaliado a presença de resposta imunitária humoral e celular nessa protecção. Além disso, detectaram, também, protecção contra sequestro em vários tecidos analisados, incluindo a medula óssea (Novacco *et al.*, 2012).

## **1.8– Sinais clínicos e alterações laboratoriais**

Os sinais clínicos de uma infecção com hemoplasmas variam bastante, dependendo de vários factores como a espécie envolvida, o estadio da infecção, a existência de uma doença concomitante e/ou stress, se se trata de infecção primária ou secundária a outro processo patológico e o grau e rapidez de desenvolvimento da anemia (Tasker, 2006; Sykes, 2010, Tasker, 2010).

Apatia, inapetência, anorexia e desidratação, pirécia e depressão, assim como perda de peso em alguns gatos, são sinais clínicos comuns de infecção com



micoplasmas hemotrópicos. Outro sinal bastante comum nestas infecções é a anemia, que se manifesta através de letargia, fraqueza, palidez das mucosas, taquipneia, taquicardia, desenvolvimento de um murmúrio cardíaco hémico e, ocasionalmente, síncope ou sinais neurológicos se a anemia é aguda e grave. Alguns proprietários dizem que os seus gatos praticam picacismo (Tasker, 2006; Sykes, 2010).

Outras anomalias detectáveis ao exame físico podem ser a linfadenopatia e a esplenomegália, a qual pode reflectir uma hematopoiese extramedular e, embora menos comum, icterícia, principalmente como resultado de hemólise grave. Alguns gatos podem apresentar-se febris enquanto os moribundos se apresentam, normalmente, hipotérmicos (Sykes, 2010; Tasker, 2010).

Relativamente a alterações laboratoriais, a mais característica no hemograma é a anemia regenerativa, com anisocitose, macrocitose, reticulocitose, policromasia, presença de corpos de Howell-Jolly e, ocasionalmente, normoblastemia marcada. Esta anemia é, normalmente, resultante de hemólise extravascular. Todavia, foi descrita hemólise intravascular num gato infectado com “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” e que se encontrava com hiperbilirrubinémia e uma hemoglobínúria apreciável (Willi *et al.*, 2005; Willi *et al.*, 2007b). A anemia pode ser pouco regenerativa se tiver ocorrido uma diminuição acentuada de HCT no início da doença ou devido a doenças concomitantes como FIV ou FeLV. No caso de anemias não regenerativas deve ser efectuada uma biópsia de medula óssea para descartar outras afecções, nomeadamente, doenças mieloproliferativas (Tilley & Smith, 2007). Em alguns gatos infectados pode visualizar-se autoaglutinação em esfregaços sanguíneos. A anemia não regenerativa pode ser observada, quer isso aconteça devido ao tempo ser insuficiente para que a regeneração ocorra, quer como resultado de uma infecção concomitante por FeLV. A infecção oculta concomitante com hemoplasmas deve ser considerada em qualquer gato positivo para FeLV com macrocitose, mesmo na ausência de reticulocitose. Gatos anémicos infectados com FIV ou FeLV devem ser sempre testados para hemoplasma concomitante, pois esta representa uma condição subjacente facilmente tratável. As contagens de leucócitos em gatos infectados com micoplasmas hemotrópicos podem estar normais, aumentadas ou diminuídas. Relativamente ao perfil de bioquímica sanguínea, podem verificar-se aumentos na alanina aminotransferase (ALT), possivelmente como consequência de dano hepático resultante de hipóxia,

hiperbilirrubinemia, que raramente é grave e, em menor frequência, azotemia pré-renal (Tilley & Smith, 2007; Sykes, 2010). Foi, ainda, descrita hipoglicemia em espécies de animais de produção infectados com hemoplasmas, sendo que a gravidade da hipoglicemia era proporcional ao grau de bacteriemia. Todavia, tal não foi detectado em estudos com gatos infectados experimentalmente (Tasker *et al.*, 2009a; Sykes 2010). A hipoglicemia é considerada possível em gatos moribundos ou se o processo na separação de células sanguíneas do plasma ou soro for demasiado lento. As concentrações de proteína no plasma são, frequentemente, normais mas podem aparecer aumentadas, devido a desidratação ou a uma resposta de fase aguda. Foi descrita ainda, embora em casos raros, ligeira hemoglobinemia (Tilley & Smith, 2007; Tasker, 2010).

### **1.9 – Achados histopatológicos**

Nos casos em que ocorre morte do animal pode ser realizada uma necropsia. Assim, podem existir alguns achados como tecidos pálidos, emaciação, em aproximadamente 75% dos gatos, esplenomegália leve a moderada, em aproximadamente 50% dos casos (Balazs *et al.*, 1961; Messick & Harvey, 2011), icterícia leve a moderada em alguns animais, assim como os linfonodos hiperplásicos, hemorrágicos ou edematosos (Small & Ristic, 1971; Messick & Harvey, 2011).

Achados histológicos anormais podem incluir hiperplasia eritróide e, por vezes, mielóide da medula óssea ou mesmo uma completa exaustão após infecção prolongada, congestão passiva, hematopoiese extramedular, eritrofagocitose e baço com aumento visível de hemossiderina nos macrófagos. Nalguns casos, pode ser observada no fígado degeneração gorda e necrose centrilobular (Balazs *et al.*, 1961; Messick & Harvey, 2011; Small & Ristic, 1971).

## 1.10 – Diagnóstico

### 1.10.1 – Diagnósticos diferenciais

Os gatos, quando exibem sinais clínicos como anemia e outros, compatíveis com hemoplasmoses, devem ser adequadamente examinados e elaborada uma lista de diagnósticos diferenciais, como a representada na tabela 3, procedendo-se à exclusão dos mesmos através de métodos auxiliares de diagnóstico.

**Tabela 3** – Lista de diagnósticos diferenciais (Adaptado de Sykes, 2010 e Tilley & Smith, 2007).

a) Anemia Hemolítica Imunomediada primária
b) Anemia Hemolítica Microangiopática
c) Infecção pelo Vírus da Leucemia Felina (FeLV)
d) Infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Felina (FIV)
e) Infecção pelo Vírus da Peritonite Infecciosa Felina (PIF)
f) Infecção por <i>Cytauxzoon felis</i>
g) Infecção por <i>Babesia spp.</i>
h) Anemia Hemolítica Corpos de Heinz (processos oxidativos – zinco, cebola, alho, anestésicos locais, propofol, peixe)
i) Deficiência na enzima piruvato quinase
j) Doença da fragilidade dos eritrócitos dos gatos Abissínio e Somali
k) Hemorragia gastrointestinal oculta

### 1.10.2 – Abordagem diagnóstica genérica

Antes de qualquer tratamento, deve ser feita uma avaliação de esfregaço de sangue fresco, teste de aglutinação, hemograma completo incluindo coloração com Novo Azul-de-Metileno para corar especificamente os corpos de Heinz, teste de Coombs, *cross-matching* e tipificação sanguínea, testes serológicos para FIV e FeLV, painel bioquímico alargado, urianálise, assim como PCR para as diferentes espécies de hemoplasma infectantes do gato. Poderá ser útil incluir um painel de coagulação.

### 1.10.3 – Diagnóstico citológico

Os micoplasmas hemotrópicos felinos não podem ser cultivados em laboratório. Por este motivo, durante muito tempo recorreu-se ao seu diagnóstico através da observação de esfregaços sanguíneos rotineiros corados com Giemsa-Wright ou coloração idêntica do tipo Romanovsky, com as características já mencionadas no capítulo da morfologia. No caso de esfregaços sanguíneos muito espessos ou quando a observação é efectuada fora da zona de monocamada, quase todos os organismos aparecem como cocos. Organismos mais em forma de bastonete ou de anel são mais facilmente observados em esfregaços finos ou na região de monocamada (Messick & Harvey, 2011).

Em menos de 50% dos casos de gatos com anemia hemolítica aguda, é possível observar *Mycoplasma haemofelis* recorrendo-se ao exame citológico de esfregaços sanguíneos, pois a presença dos microorganismos nos esfregaços é intermitente (Sykes, 2010). Foi recomendado que os esfregaços sanguíneos sejam efectuados o mais próximo possível do momento da colheita e a não utilizar EDTA como anticoagulante, pois este pode provocar a libertação dos organismos da superfície dos eritrócitos, o que pode levar a falsos negativos no exame citológico. Assim, será preferível o uso de tubos com heparina ou sem anticoagulante nos casos em que o esfregaço seja feito imediatamente após a colheita (Tasker & Lappin, 2002). Quando os organismos são visualizados nos esfregaços sanguíneos, trata-se, normalmente, de *Mycoplasma haemofelis*. “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” nunca foi observado em esfregaços sanguíneos. “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” não é, geralmente, observado no caso de gatos infectados cronicamente e, apesar de ser de menores dimensões que *Mycoplasma haemofelis*, pode ser difícil ou impossível distingui-los uns dos outros baseando o diagnóstico somente nas suas dimensões (Sykes, 2010). Quando observados, aparecem como organismos de reduzidas dimensões (medem aproximadamente metade de *Mycoplasma haemofelis*, cerca de 0.3  $\mu\text{m}$ ), corando de forma menos densa e sendo detectados em reduzido número por cada eritrócito. Contudo, esta diferença de tamanhos foi desafiada pela descoberta de um isolado de “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” na Grã-Bretanha com 0.6  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Daqui se conclui que o aspecto morfológico, por si só, não é fiável para distinguir os diferentes isolados, pelo que é necessária análise genética para uma identificação correcta da espécie presente (Messick & Harvey, 2011).

Diagnósticos falso positivos ocorrem, com frequência, quando há precipitados de corante, ponteados basofílicos, corpos de Howell-Jolly, corpos de Heinz e corpos de Pappenheimer (agregados de cobre acumulado, que aparecem como grânulos de pequenas dimensões a corar de azul), que podem ser confundidos com o agente (Tilley & Smith, 2007). Por este motivo, é fácil perceber que se trata de uma técnica diagnóstica com muito pouca sensibilidade para a detecção dos agentes. Em vários estudos, a sensibilidade do diagnóstico citológico variou de 0 a 37.5%, valor que poderá dever-se a flutuações cíclicas da bacteriemia em infecções agudas com *Mycoplasma haemofelis*, ao seu reduzido tamanho e ao reduzido número de bactérias presentes em infecções com “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” e “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” (Messick *et al.*, 1998; Tasker, 2006). A coloração com Laranja de Acridina e métodos de fluorescência directa com anticorpos demonstraram ser mais sensíveis do que a coloração rotineira tipo Romanovsky. A utilização do corante Laranja de Acridina resulta na observação dos microorganismos de cor amarelo-clara a laranja sob um fundo amarelo-esverdeado, indicando um elevado conteúdo em RNA e possível presença de DNA. Uma limitação da utilização destas técnicas é a necessidade de ter um microscópio de fluorescência. Além disso, e embora mais sensível que a técnica com esfregaço sanguíneo rotineiro corado com Giemsa, ainda tem uma sensibilidade que não é muito elevada, para não falar das necessidades e custos que advêm da técnica mais complexa (Small & Ristic, 1971; Bobade *et al.*, 1987; Tasker & Lappin, 2002; Sykes, 2010).

#### **1.10.4 – Diagnóstico molecular**

A técnica de PCR para o diagnóstico de hemoplasmas felinos foi desenvolvida para detectar o gene de *16S rRNA* e encontra-se amplamente distribuída por laboratórios de diagnóstico e entidades de pesquisa veterinária. Esta é uma técnica molecular potente e sensível que permite a amplificação exponencial de fragmentos específicos de DNA em número reduzido, de forma a serem detectáveis. É consideravelmente mais sensível do que a avaliação de esfregaços sanguíneos (Sykes, 2010). De acordo com um estudo comparativo entre os métodos de diagnóstico citológico e a PCR, em gatos infectados experimentalmente, foram obtidas taxas de detecção de 37.5% e de 100%,

respectivamente (Tasker & Lappin, 2002). Todavia, esta última técnica pode não detectar de forma consistente o organismo em gatos portadores assintomáticos. Na PCR convencional, a presença de bandas num gel de electroforese é considerada como um resultado positivo e na PCR em tempo real, a detecção do produto de amplificação é feita de forma fluorométrica, recorrendo-se a sondas ou corantes fluorescentes (Sykes, 2010); esta última permite, ainda, quantificar o DNA de hemoplasma presente na amostra (Tasker *et al.*, 2003c; Braddock *et al.*, 2004). Algumas PCRs convencionais não distinguem “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” de *Mycoplasma haemofelis*. As PCRs em tempo real são, geralmente, específicas para as espécies e, por isso, poderão ser menos propensas a apresentar resultados falso positivos derivados de contaminação, pois os tubos não são, geralmente, abertos para detectar os produtos de PCR (Sykes, 2010). Para além disso, têm demonstrado ser úteis para testar gatos clinicamente saudáveis, enquanto potenciais dadores de sangue para transfusões sanguíneas ou, então, que vão integrar colónias específicas livres de patógenos (Martinez-diaz *et al.*, 2013). Ocasionalmente, variantes de estirpes dos hemoplasmas podem não ser detectadas usando-se PCR em tempo real, resultando num falso negativo. As PCRs podem ser denominadas de *singleplex*, quando um único organismo é pesquisado, ou *multiplex* quando, numa só técnica, é possível detectar mais do que uma espécie (Sykes, 2010), o que em muitos casos se pode revelar vantajoso, nomeadamente para detecção das três principais espécies de hemoplasma infectantes do gato e na detecção de hemoplasmose em potenciais dadores de sangue. Apresenta como vantagens a diminuição de tempo e o menor custo da técnica (Suksai *et al.*, 2010).

De extrema importância, quando se interpretam os resultados de testes diagnósticos, é a diferença do potencial patogénico entre os vários agentes hemotrópicos. Resultados positivos para um determinado teste para cada hemoplasma, mas especialmente “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” e “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”, não implicam necessariamente que estes agentes causem anemia e, como tal, vários outros diagnósticos diferenciais deverão ser considerados (Sykes, 2010). Isto acontece pois a detecção de ácidos nucleicos do agente patogénico na amostra não indica necessariamente que esteja em curso uma infecção activa ou doença, mas apenas que o material do organismo existe no hospedeiro e não necessariamente que a bactéria está viável, capaz de se replicar ou está, de facto, a causar os sinais

clínicos no hospedeiro (Veir & Lappin, 2010). Esfregaços de sangue seco podem, também, ser utilizados para PCR, mas são menos sensíveis quando comparados com sangue total, possivelmente devido à existência de menor número de células a partir das quais se possa extrair o DNA. Isto revela-se especialmente importante no caso de suspeita de “*Candidatus Mycoplasma turicensis*”, devido ao reduzido número de organismos presentes. Revela-se útil o recurso a esta técnica quando não estão disponíveis grandes quantidades de sangue, no caso de estudos retrospectivos ou após o início da terapêutica antibiótica (Sykes *et al.*, 2008). Pode, também, detectar-se a presença de hemoplasmas felinos por PCR directa utilizando-se sangue total e sem necessidade de extracção de DNA (Watanabe *et al.*, 2008). Como principais vantagens que advêm do seu uso tem-se a redução do tempo requerido, trabalho necessário e custo do procedimento técnico, podendo ter utilidade para evitar contaminação e confusão de amostras. Porém, pode ser ligeiramente menos sensível que a PCR convencional e menos sensível que a PCR em tempo real. O tratamento com fármacos antimicrobianos pode resultar em falsos negativos na PCR devido à possibilidade de a terapêutica diminuir a quantidade de organismos infectantes abaixo do nível de detecção da técnica (Veir & Lappin, 2010) pelo que, sempre que possível, a colheita de sangue deve ser efectuada antes de se iniciar a terapêutica. Criado-Fornelio e colaboradores (2003) descrevem uma técnica de Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP, do inglês “Restriction Fragment Length Polymorphism”) para distinção das três diferentes espécies de hemoplasma que podem infectar os gatos, presentes em amostras de sangue. Esta técnica possibilita, também, a detecção de infecções mistas, em amostras amplificadas por PCR convencional com primers específicos para *Mycoplasma* spp. (Criado-Fornelio *et al.*, 2003). Este PCR-RFLP servirá de base para a parte experimental desenvolvida na presente dissertação.

### 1.10.5 – Outros meios de diagnóstico

Têm sido várias as tentativas de desenvolver novos métodos de diagnóstico que, tal como a PCR, sejam sensíveis e específicos mas que impliquem menos tempo e menores custos. Nesse sentido, um grupo de investigadores desenvolveu uma técnica de citometria de fluxo para detecção de hemoplasmas que permite a diferenciação entre as duas principais espécies infectantes no gato – *Mycoplasma haemofelis* e “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” – baseado no tamanho, e que se prevê possa ser aplicado no diagnóstico de hemoplasmoses noutras espécies como o cão, espécies de produção e até nos humanos (Sánchez-Pérez *et al.*, 2013). Foram, também, documentados estudos recorrendo-se a outras técnicas moleculares para detecção de hemoplasmas como o Western Blott. Esta última técnica tem sido, também, usada para avaliação de resposta imunitária e caracterização antigénica (Alleman *et al.*, 1999).

Têm sido várias as tentativas para desenvolver testes serológicos, mas tal tarefa tem sido dificultada pela impossibilidade de cultivar os micoplasmas hemotrópicos *in vitro*, pelo que mais estudos deverão ser efectuados na área (Willi *et al.*, 2007b; Barker *et al.*, 2010; Peters *et al.*, 2010; Wolf-Jackel *et al.*, 2010; Messick & Santos, 2011). O desenvolvimento destas técnicas, enquanto testes de diagnóstico, seria particularmente relevante e útil para determinar a existência de infecção crónica por hemoplasmas.

### 1.11– Tratamento

O tratamento da infecção por micoplasmas está indicado, apenas, para gatos com sinais clínicos e análises laboratoriais consistentes com Anemia Infecciosa Felina. O tratamento de gatos positivos por PCR não anémicos não está recomendado, porque não foi ainda identificado um tratamento que elimine o agente infeccioso, apenas se verificando redução ou eliminação da bacteriemia (Sykes, 2010; Messick & Harvey, 2011).

Para o tratamento de animais infectados com hemoplasmoses, nos casos em que tal é necessário, recorre-se a antibioterapia. Os agentes etiológicos que têm vindo a ser referidos são sensíveis a tetraciclinas, as quais inibem de forma específica a síntese de proteínas em procariotas. O tratamento recomendado para a hemoplasmoses consiste na



administração diária de doxiciclina, (10 mg/kg), por via oral (PO, da locução latina *per os*), durante um período mínimo de duas semanas (Tasker & Lappin, 2002). Após a administração deste fármaco, está recomendada a administração de um bólus de vários mililitros (mL) de água, devido ao potencial para provocar esofagite, como evidenciado por Macgrotty e colaboradores (2002).

Enquanto alternativa viável, nas situações em que a doxiciclina não é efectiva, pode recorrer-se a fluoroquinolonas. A enrofloxacin (5 mg/kg/dia PO) é uma alternativa adequada (Dowers *et al.*, 2002), mas tem o potencial de causar retinotoxicidade e, consequentemente, cegueira, principalmente se em doses superiores (Sykes, 2010; Messick & Harvey, 2011). A marbofloxacin não causa esses danos oculares (Ishak *et al.*, 2008), pelo que o seu uso como antibiótico de segunda linha parece ser mais adequado, numa dose de 2 mg/kg/PO, uma vez por dia (SID, da locução latina *semel in die*). O tratamento de gatos infectados com *Mycoplasma haemofelis* com a fluoroquinolona pradofloxacin pode oferecer uma eliminação mais efectiva a longo prazo. Poucos dados existem sobre o uso de antibióticos para tratar infecções provocadas por “*Candidatus Mycoplasma turicensis*”, nas quais pode ocorrer eliminação espontânea da bacteriemia (Sykes, 2010; Messick & Harvey, 2011).

Podem, ainda, existir problemas de resistência aos antibióticos administrados como evidenciado por Groebel e colaboradores (2008), no caso de um isolado de *Mycoplasma suis* que conseguiu penetrar em eritrócitos suínos, sendo esta localização responsável pela resistência marcada à terapêutica instituída.

A anemia resultante da infecção com micoplasmas hemotrópicos é, em parte, de natureza imunomediada, pelo que se recomenda a terapêutica com córticos, adjuvante do tratamento antibacteriano (Tasker, 2010). Porém, o uso de doses imunossupressoras de glucocorticóides é controverso, dado que os corticóides podem reactivar a infecção latente (Sykes, 2010), atrasar a eliminação de hemoplasmas (Tasker, 2010), e levar a um desenvolvimento de uma anemia mais grave, tal como descrito num gato infectado com “*Candidatus Mycoplasma turicensis*”, que tinha previamente recebido acetato de metilprednisolona (Willi *et al.*, 2005). Esta situação revela-se particularmente importante em situações de doenças concomitantes, que podem ser exacerbadas com o tratamento à base destes compostos (Willi *et al.*, 2007b). O uso dos glucocorticóides (1

mg/kg/PO) deve ser reservado para gatos que não respondem à terapêutica com antimicrobiano sozinho, cujo diagnóstico é incerto, em que existe uma forte suspeita de anemia hemolítica imunomediada como principal componente, ou em casos em que a infecção por hemoplasmas não é vista como a principal causa de doença (Willi *et al.*, 2007b; Sykes, 2010; Tasker, 2010).

Gatos clinicamente doentes com hemoplasmoses graves encontram-se, frequentemente, desidratados, o que implica uma correcção de desequilíbrios hidro-electrolíticos com fluidoterapia endovenosa (Sykes 2010; Messick & Harvey, 2011). Tasker (2010) recomenda uma dose de 5-10 mL/kg, em gatos, a uma taxa de 0.5-2 mL/kg/h.

Os parâmetros hematológicos devem ser monitorizados e, se a anemia decorrente da doença é grave, com HCT <12%, podem ser necessárias transfusões sanguíneas com eritrócitos ou sangue total, que devem ser efectuadas após tipificação sanguínea e *cross-matching* do dador e do receptor (Sykes, 2010; Tasker, 2010; Messick & Harvey, 2011). Pode ponderar-se, também, o recurso a compostos de hemoglobina portadora de oxigénio como a oxiglobina.

### **1.12 – Prevenção**

Apesar do conhecimento existente sobre os factores de risco e vias de transmissão ainda não ser muito, e tendo em conta o já referido, as formas de prevenção de transmissão do agente passam pela eliminação e controlo do contacto dos gatos com vectores artrópodes hematófagos, como pulgas e carraças. Nos animais com dono, deve controlar-se o acesso ao exterior, para evitar actividades de luta com outros gatos envolvendo arranhadelas e mordeduras, de forma a impedir que ocorra a transmissão iatrogénica dos agentes hemotrópicos. Todos os animais futuros dadores de sangue devem ser testados, recorrendo a PCR, só sendo seleccionados aqueles cujo resultado tenha sido negativo para todas as espécies de hemoplasma.

### 1.13 – Implicações na saúde pública

Foram vários os casos de hemoplasmas que faziam lembrar os de cães e gatos e de outros animais, documentados em humanos, ao longo dos tempos. Porém, antigamente, o diagnóstico era feito através da observação microscópica dos mesmos na superfície dos eritrócitos, em esfregaços sanguíneos o que, como já foi referido, pode resultar em falsos positivos, estando dependente da observação por patologistas clínicos com experiência, o que nem sempre ocorre. Destes casos, destacam-se: um de um indivíduo esplenectomizado que contraiu uma infecção bacteriana epieritrocítica (Archer *et al.*, 1979) e outro de uma jovem de 21 anos, em que a infecção com micoplasmose hemotrópica foi detectada aproximadamente na mesma altura em que o lúpus eritematoso sistémico, possivelmente devido à imunodepressão causada por esta afecção sistémica (Bosnic *et al.*, 2010). De acordo com os casos mencionados antes, e pelo motivo atrás referido, é necessário olhar para estes relatos de casos com cautela, pois muitos não são verdadeiros casos, como evidenciado em Tasker *et al.*, (2010). Mais recentemente, e com o emergir das técnicas moleculares de diagnóstico, como a PCR, foram documentados vários casos de hemoplasmoses em humanos, nomeadamente em indivíduos com contacto próximo com animais, quer a nível doméstico, quer ocupacional. Segundo dados de 2000 e 2009, existem prevalências de micoplasmas hemotrópicos bastante elevadas, em humanos, na China, principalmente em situações de grande contacto com os animais e de fracas condições higiénicas (Yang *et al.*, 2000; H.z.Yin *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2009). Ainda na China, foi descoberto um hemoplasma num humano com anemia de etiologia desconhecida (Yuan *et al.*, 2007). De acordo com dos Santos e colaboradores (2008), foi detectado *Mycoplasma haemofelis* usando-se a técnica de PCR, num humano proveniente do Brasil, infectado com o Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH), que se encontrava com uma co-infecção por *Bartonella henselae* e que convivia com 5 gatos, todos eles positivos para este agente. No Texas, foi detectada, num veterinário, uma co-infecção com *Bartonella henselae* e organismos tipo *Mycoplasma* (Sykes *et al.*, 2010). Foi, ainda, documentado o caso de uma mulher com 62 anos com anemia hemolítica e pirécia, no Reino Unido, em que foi detectada uma nova espécie de hemoplasma responsivo à terapêutica (Steer *et al.*, 2011). Todos os casos anteriormente referidos sugerem que *Mycoplasma haemofelis* e outros micoplasmas hemotrópicos podem ter um potencial zoonótico, que se revela

especialmente importante quando se verifica a presença de doenças concomitantes que envolvem algum grau de imunossupressão. Assim, e apesar de a informação actual sobre este potencial não ser extensa, sendo necessários mais estudos na área, aconselha-se a ter cuidado quando se manipula sangue ou tecidos de gatos infectados, até que se entenda melhor qual o verdadeiro risco destes organismos para a saúde humana (Sykes, 2010).

Em Portugal, existem alguns artigos referentes a estudos de prevalência de hemoplasmas felinos, um no Norte e Centro do país, outro no Centro e Sul, um na região de Almada e outro em Parede. O estudo da presente dissertação refere-se a uma zona geográfica muito restrita, sendo interessante ver de que forma o isolamento afecta os resultados obtidos e como estes se relacionam com os já existentes sobre a doença no País. Assim, o objectivo do presente trabalho foi, através de técnicas moleculares, avaliar a presença e a extensão da infecção pelas três principais espécies de micoplasmas hemotrópicos felinos, em gatos errantes de uma colónia que habita a Ilha de Faro. Foi, ainda, intenção, identificar possíveis factores de risco associados à infecção causada por estes agentes infecciosos.

## 2 – Material e Métodos

### 2.1 – Descrição da população

A população estudada foi constituída por 157 gatos errantes residentes na Ilha de Faro que foram sujeitos a uma campanha de esterilização por parte da Associação “Change for Animals Foundation”, em colaboração com a FMV-ULHT. A recolha das amostras utilizadas no presente estudo, decorreu entre 10 e 28 de Outubro, tendo sido efectuada pelos veterinários em campo na Ilha de Faro, como parte dos procedimentos pré-cirúrgicos. Da totalidade das amostras recolhidas faziam parte sangue em tubo com EDTA, sangue em tubo seco, fezes, os órgãos genitais após a realização do procedimento electivo, carraças e pulgas, quando existentes, e pele da orelha. Para o estudo conducente à presente dissertação, foi utilizado sangue em tubo com EDTA. Após a colheita, as amostras de sangue foram transportadas para o LACH, onde foram conservadas a -80°C até ao momento do seu processamento. Este teve início em Julho de 2015.

Para cada um dos animais, foi efectuado um registo, por parte do médico veterinário responsável, contendo os seguintes elementos: espécie, idade, género, presença de pulgas, presença de carraças e alguns sinais clínicos (lesões dérmicas, linfadenopatia, lesões oculares, atrofia muscular, epistáxis, palidez das mucosas, diarreia, entre outros). A cada registo foi atribuída uma classificação numérica tendo os gatos sido caracterizados nas várias vertentes anteriormente referidas.

Quanto à idade, os animais foram divididos em três grupos: i) juvenil, com idade inferior a um ano, ii) adulto, com idade superior a um ano e iii) sénior, com idade superior a 10 anos.

Todos os registos e classificação, para os gatos positivos para *Mycoplasma* spp., podem ser observados na tabela 10 do apêndice III.

## **2.2 – Extracção de DNA**

O procedimento de extracção de DNA foi realizado recorrendo-se ao kit comercial *DNeasyR Blood & Tissue Kit* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante relativas à extracção de DNA total de amostras de sangue. Este procedimento visa isolar e purificar o DNA, provocando a sua libertação das células. Para que tal ocorra, é necessária a lise da parede celular e das membranas celular e nuclear. Esta lise que, no caso da presente dissertação, foi feita por via enzimática, ocorre com recurso à proteinase K, a qual degrada as proteínas celulares e inactiva as DNAses. Como consequência deste processo, o DNA fica numa conformação menos compacta, resultando numa melhor amplificação. Para dissociar proteínas e vários outros contaminantes existentes em suspensão e isolar o DNA, recorreu-se a um método de extracção em fase sólida. Este consiste na adsorção de DNA a uma membrana de sílica, quando o lisado celular é colocado numa coluna de rotação DNeasy Mini. Durante a centrifugação, o DNA liga-se de forma selectiva à membrana de sílica, à medida que os contaminantes passam, na presença de elevadas concentrações de um sal, que vão ajudar a remover a água de moléculas hidratadas existentes em solução. Os restantes contaminantes e enzimas inibidoras são removidos em vários passos de lavagem consecutivos com tampões específicos e o DNA é eluído em água desionizada estéril.

### **Procedimento experimental de extracção de DNA**

As amostras sanguíneas foram descongeladas mantendo-as, durante alguns minutos, na estufa a 37°C. Posteriormente, foram pipetados 120 µL de Tampão Fosfato Salino (PBS, do inglês “Phosphate-Buffered Saline”), 20 µL de Proteinase K e 100 µL de sangue proveniente da amostra, para o número de microtubos igual ao das amostras das quais se pretendia extrair o DNA. Os reagentes foram pipetados pela ordem em que se encontram descritos anteriormente. De seguida pipetaram-se 200 µL de Buffer AL para cada um dos microtubos. Foram, depois, agitados num vórtex Mixer (Citomed Labnet International Inc.), sujeitos a *short-spin* durante dez a quinze segundos numa centrífuga (VWR Galaxy 14D), após o que foram incubados a 56°C em banho-maria (Memmert),

durante um período mínimo de dez minutos. Depois deste passo, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de etanol a 96%, tendo de seguida ido a agitar ao vórtex, após o que foram sujeitas a *short-spin*. Posteriormente, preparou-se o número de colunas de acordo com o número de amostras, identificaram-se e pipetou-se toda a mistura resultante dos passos anteriores para as colunas. Estas foram centrifugadas a  $5200 \times g$  durante três minutos, após o que se descartou o líquido filtrado e o tubo colector. As colunas foram colocadas em novos tubos colectores, tendo-lhes sido adicionados 500  $\mu\text{L}$  de Buffer AW1. Realizou-se nova centrifugação a  $5200 \times g$  durante um minuto. Depois, descartaram-se o líquido filtrado resultante e o tubo colector e colocaram-se as colunas em novos tubos colectores, tendo de seguida sido adicionados 500  $\mu\text{L}$  de Buffer AW2 e levado a centrifugar a  $14.000 \times g$  durante três minutos. Descartou-se o líquido filtrado e recolocaram-se as colunas nos tubos colectores, seguindo-se nova centrifugação a  $14.000 \times g$  durante um minuto. Transferiram-se as colunas para microtubos devidamente identificados, consoante o número de amostras no processo, adicionaram-se 100  $\mu\text{L}$  de água destilada, deixando incubar à temperatura ambiente durante um minuto e realizou-se uma centrifugação a  $5200 \times g$  durante um minuto. Por último, retiraram-se as colunas, ficando nos microtubos o DNA que foi eluído com a água. O DNA foi armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até ser utilizado na reacção de PCR.

### **2.3 – Avaliação do grau de pureza do DNA genómico e sua integridade física**

Para avaliar a qualidade e a integridade física do DNA extraído recorreu-se a uma electroforese em gel de agarose a 0,8% (m/v), numa tina Enduro Horizontal Gel Box-Electrophoresis (Labnet).

O procedimento experimental foi o seguinte:

1. Pesou-se a massa de agarose (Seakem LE Agarose, Lonza) num erlenmeyer,
2. Adicionou-se o tampão Tris-Borato (90 mM) - EDTA (2mM), pH 8.3 (TBE 1  $\times$ ),

3. Juntou-se o preparado e levou-se ao microondas até que ocorresse fusão total da agarose; homogeneizou-se até se obter um líquido homogéneo e de aspecto translúcido e arrefeceu-se agitando o erlenmeyer debaixo de água corrente,
4. Montou-se o suporte do gel com os pentes de forma a formar os poços do gel,
5. Adicionou-se ao gel de agarose GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium), numa proporção de 0,42 µL/100mL de gel,
6. Colocou-se o gel de agarose no suporte de electroforese, para este polimerizar,
7. Quando o gel de agarose estava totalmente solidificado, colocou-se na tina de electroforese,
8. Prepararam-se as amostras a aplicar no gel adicionando a 10 µL de DNA genómico (gDNA) 1,5 µL de *loading buffer* [glicerol 30% (m/v), azul de bromofenol 0,25% (m/v)],
9. Colocou-se o gel solidificado na tina de electroforese com tampão TBE 1× de forma a cobrir completamente o gel,
10. Aplicaram-se as amostras nos poços do gel, ligou-se a fonte de alimentação (Pharmacia LKB-GPS 200/400) e realizou-se a electroforese a 100 – 120 Volt (V) durante, aproximadamente, 60 minutos,
11. Depois de terminada a migração, observou-se o gDNA num transiluminador UV Alfa Gene, por emissão de fluorescência do GelRed.

## **2.4 – Amplificação dos genes de interesse por PCR**

### **2.4.1 – Amplificação do gene da Beta-glucuronidase Felina (*fGUSB*)**

Para assegurar a ausência de inibidores da enzima DNA polimerase todas as amostras foram submetidas a reacção de PCR para a amplificação de um fragmento do gene do gato que codifica a enzima beta-glucuronidase felina (*fGUSB*).



A enzima beta-glucuronidase felina é uma glicosidase, localizada nos lisossomas (vesículas membranares que contêm enzimas hidrolíticas envolvidas na digestão intracelular).

De forma a amplificar uma sequência parcial do gene *fGUSB* com 177 pares de bases, foi efectuada uma PCR convencional com 2 a 7 µL de gDNA extraído por 25 µL de mistura reaccional total, contendo uma concentração final de 10 picomol (pmol) de cada primer específico (tabela 4), 1× MyTaq Reaction Buffer (Bioline), 1 U de MyTaq DNA Polimerase (Bioline) e água desionizada estéril até perfazer o volume final.

Os primers específicos utilizados para amplificação da enzima *fGUSB* encontram-se descritos na tabela 4. As condições de amplificação consistiram num passo inicial de desnaturação a 95°C, durante 1 minuto, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95°C, durante 15 segundos, *annealing* a 55°C, durante 15 segundos, e extensão a 72°C, durante 15 segundos; a reacção termina após uma extensão final a 72°C, durante 7 minutos. A reacção de PCR foi efectuada num termociclador Rotor Gene-Q series (QIAGEN). Em todas as reacções de PCR, foi incluído um controlo negativo e um controlo positivo.

**Tabela 4** – Sequência de *primers* específicos para amplificação de um fragmento do gene *fGUSB*.

Região Alvo	Sequência dos <i>primers</i> (5'-3')	Dimensão (pb)
<i>fGUSB</i>	Fw: GCGTTCCTTTTGCGAGAGAG	177
	Rev: GCTGTGGAAGTTGCCCCTTA	

Após o término da reacção de PCR, as amostras foram sujeitas a electroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v) e visualizadas num transiluminador por emissão de fluorescência do GelRed, conforme o procedimento descrito em 2.3. Em paralelo com os produtos de PCR, foram aplicados num dos poços do gel 7 µL do marcador de pesos moleculares Hypperladder IV (Bioline).

#### 2.4.2 – Amplificação de DNA de Micoplasmas Hemotrópicos Felinos

Todas as amostras foram testadas para a presença de *Mycoplasma* spp. Foi efectuada uma PCR com 5 a 10 µL de DNA extraído por 25 µL de mistura reaccional total, contendo uma concentração final de 10 pmol de cada primer específico (tabela 5), 1× MyTaq Reaction Buffer (Bioline), 1U de MyTaq DNA Polimerase (Bioline) e água desionizada estéril até perfazer o volume final.

As condições da PCR consistiram num passo inicial de desnaturação a 94°C, durante 3 minutos, seguido de 40 ciclos de desnaturação a 94°C, durante 30 segundos, *annealing* a 58°C, durante 30 segundos, e extensão a 72°C durante 48 segundos; a extensão final foi realizada a 72°C, durante 5 minutos. A reacção de PCR foi efectuada num termociclador Rotor Gene-Q series (QIAGEN). A técnica utilizada foi uma PCR convencional com primers universais para *Mycoplasma* spp. com as sequências descritas na tabela 4, que produzem fragmentos de 595 pares de bases (pb) para *Mycoplasma haemofelis* e 618 pb para “*Candidatus* *Mycoplasma haemominutum*”, os quais, quando se obtém um resultado positivo, não se distinguem devido ao facto de os fragmentos terem dimensões muito próximas e terem um padrão de migração idêntico.

**Tabela 5** – Sequência dos *primers* universais para amplificação de DNA de *Mycoplasma* spp. (Criado-Fornelio *et al.*, 2003).

Sequência dos <i>primers</i> (5'-3')	Dimensão (pb)
Fw: ATACGGCCCATATTCCTACG	<i>Mycoplasma haemofelis</i> : 595
Rev: TGCTCCACCACTTGTTCA	“ <i>Candidatus</i> <i>Mycoplasma haemominutum</i> ”: 618

Após o término da reacção de PCR, as amostras foram sujeitas a electroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v) e visualizadas por emissão de fluorescência do GelRed, tal como descrito em 2.3. Em paralelo com as amostras foram aplicados, num dos poços do gel, 7 µL do marcador de pesos moleculares Hypperladder IV (Bioline). Em todas as reacções foram incluídos dois controlos negativos para garantir que não houve contaminação durante o procedimento, dado que se tratam de agentes ubiquitários. Foi, ainda, incluído, um controlo positivo.

De forma a garantir a reprodutibilidade da técnica de PCR anteriormente descrita para detecção de *Mycoplasma* spp., foi efectuada uma repetição da técnica em 10 % das amostras que tinham dado, previamente, resultados negativos. Todas as amostras com resultado positivo foram, também, repetidas.

Durante a realização dos procedimentos moleculares referidos anteriormente, foram tomadas todas as precauções de forma a evitar a contaminação cruzada. Entre elas incluem-se a separação de áreas de trabalho para manipular DNA e produtos de PCR, a limpeza das bancadas de trabalho e dos vários materiais usados com uma solução de hipoclorito de sódio a 10% e a descontaminação de materiais (pipetas, caixas com pontas, microtubos e suportes), antes da PCR, com recurso a luz UV, numa câmara de fluxo laminar Bio48M (Faster), durante um período mínimo de 20 minutos.

## **2.5 – Hidrólise dos produtos de PCR com enzimas de restrição para identificação da espécie de *Mycoplasma* spp.**

Para se determinar a espécie de hemoplasma presente nas amostras em estudo, de entre as três espécies mais importantes que se consideram, efectou-se uma hidrólise dos fragmentos amplificados por PCR com os primers universais para *Mycoplasma* spp, com três enzimas de restrição – *Xce* I, *EcoR* I, *Tai* I (Thermo Scientific). Os perfis de restrição são apresentados na tabela 6.

Para cada enzima de restrição, a reacção de hidrólise foi efectuada, de acordo com as instruções do fabricante, contendo 2 µL de enzima, 2 µL do respectivo tampão, 10 µL a 15 µL de produto de PCR e 18 µL de água desionizada estéril. A hidrólise aconteceu por incubação da mistura reaccional, a 37°C durante, pelo menos, 2 horas.

**Tabela 6** – Perfis de restrição dos produtos de PCR para identificação da espécie de micoplasma (Adaptado de Criado-Fornelio *et al.*, 2003).

Espécie	Dimensão dos fragmentos de restrição (pb)		
	Enzima <i>Xce</i> I	Enzima <i>EcoR</i> I	Enzima <i>Tai</i> I
<i>Mycoplasma haemofelis</i>	298, 297	Não corta	Não corta
“ <i>Candidatus</i> <i>Mycoplasma haemominutum</i> ”	Não corta	271, 347	Não corta
“ <i>Candidatus</i> <i>Mycoplasma turicensis</i> ”	593, 34 ou não corta	Não corta	507, 120

Terminada a incubação, a visualização dos resultados foi feita submetendo as amostras a electroforese em gel de agarose a 3%, conforme descrito em 2.3. Em paralelo com as amostras, num dos poços do gel, foram aplicados 7 µL do marcador de pesos moleculares Hyperladder IV (Bioline), para permitir estimar a dimensão dos fragmentos obtidos.

## 2.6 – Purificação e sequenciação de fragmentos amplificados por PCR

Em quatro das amostras positivas não foi possível, através do perfil de restrição com as enzimas em estudo, fazer a identificação da espécie de micoplasma. Para que estes resultados não permanecessem por clarificar, procedeu-se à sequenciação dos respectivos produtos de PCR.

Os produtos de PCR a sequenciar foram, primeiro, purificados através do *kit* comercial “JETQUICK PCR product Purification spin kit” (Genomed), de acordo com as instruções do fabricante, a seguir descritas.

O procedimento de purificação dos produtos de PCR foi o seguinte:

1. Pipetou-se todo o produto de PCR para um microtubo de 1,5 mL e adicionaram-se 200 mL do reagente H1,
2. Homogeneizou-se a mistura, realizando um *short spin* para juntar toda a mistura no fundo do tubo,
3. Colocou-se uma coluna num tubo de recolha, identificando a coluna com o número da amostra em estudo,
4. Pipetou-se para dentro da coluna toda a mistura preparada nos passos 1 e 2,
5. Centrifugou-se à velocidade máxima, durante 1 minuto,
6. Desprezou-se o líquido que ficou no tubo de recolha,
7. Colocou-se a coluna de novo no mesmo tubo de recolha e adicionaram-se 250 mL do reagente H2,
8. Centrifugou-se à velocidade máxima, durante 1 minuto,
9. Desprezou-se o líquido que ficou no tubo de recolha,
10. Colocou-se a coluna de novo no mesmo tubo de recolha e centrifugou-se à velocidade máxima, durante 1 minuto,
11. Colocou-se a coluna num microtubo de 1,5 mL previamente identificado com o número da amostra em estudo,
12. Adicionaram-se, no centro da coluna, 50 mL de água desionizada estéril e centrifugou-se à velocidade máxima, durante 2 minutos,
13. Eliminou-se a coluna e guardou-se o microtubo para posterior sequenciação do fragmento amplificado.

Os produtos de PCR assim purificados foram enviados para a empresa STABVida, onde foram submetidos a reacção de sequenciação pelo método de Sanger. As sequências de DNA foram determinadas em ambos os sentidos, tendo sido obtida uma sequência consenso, por comparação das sequências directa e reversa.

As sequências nucleotídicas consenso foram, depois, analisadas através do programa “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) (disponível em [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch)), para obter a identificação da espécie de micoplasma.

## **2.7 – Análise Estatística**

A análise estatística dos resultados foi realizada com recurso ao programa Microsoft Office Excel 2007 e ao software estatístico Statistical Package for Social Sciences (IBM SPSS, versão 22). Inicialmente, foi feita uma abordagem de estatística descritiva com análise de frequências, para caracterização da população em estudo quanto às várias variáveis. Posteriormente, com recurso ao teste de qui-quadrado, foi procurada a existência de eventuais relações entre um resultado positivo na reacção de PCR e as variáveis sexo, idade e presença de ectoparasitas. Foi, ainda, numa segunda fase, procurada a existência de relações entre as variáveis intrínsecas dos animais positivos e os sinais clínicos.

### **3 – Resultados**

#### **3.1 – Estatística descritiva da população em estudo**

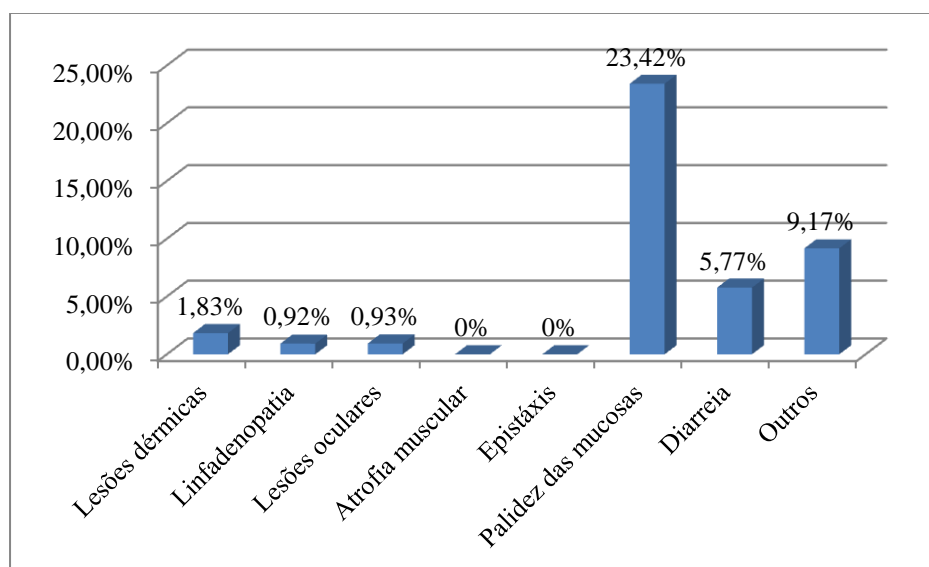
A população em estudo no presente trabalho era constituída por 157 gatos errantes, residentes na Ilha de Faro, aos quais foi feita uma recolha de sangue periférico e preenchida uma folha de registo com dados clínicos e epidemiológicos. Contudo, em algumas das 157 amostras de sangue em estudo, o registo encontrava-se incompleto para alguns dados de variáveis não analíticas. Os resultados obtidos foram trabalhados tendo em conta a existência de dados em falta.

Dos animais para os quais era conhecido o sexo, 50,4% (65/129) eram machos e 49,6% (64/129) eram fêmeas.

Dos animais para os quais era conhecida a idade, 26,4% (33/125) eram juvenis, com idade inferior a 1 ano, e 73,6% (92/125) eram adultos, com idade superior a 1 ano.

Dos animais cuja informação sobre a presença de ectoparasitas era conhecida, 34,2% (41/120) tinham pulgas. Nenhum dos animais estudados tinha carraças.

Dos animais cuja informação sobre os diferentes sinais clínicos exibidos era conhecida, 23,42% (26/111) apresentavam palidez das mucosas, 5,77% (6/104) apresentavam diarreia, 1,83% (2/109) apresentavam lesões dérmicas, 0,93% (1/108) apresentavam lesões oculares, 0,92% (1/109) apresentavam linfadenopatia e 9,17 % (10/109) apresentavam outros sinais clínicos para além dos referidos. Nenhum dos animais apresentava atrofia muscular ou epistáxis. Esta distribuição encontra-se evidenciada na figura 10.

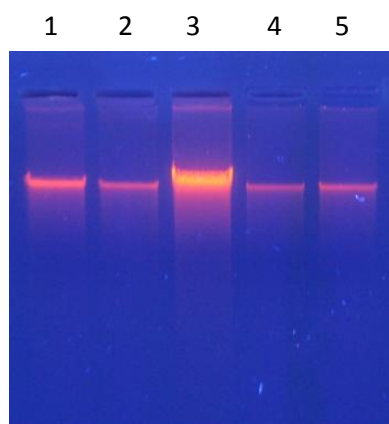


**Figura 10** – Percentagem de sinais clínicos exibidos referente aos gatos dos quais se tinha informação.

### 3.2 – Avaliação da integridade física do DNA genómico

O DNA genómico extraído foi considerado com boa integridade física quando se obtinham, na electroforese em gel de agarose, bandas evidentes, de elevado peso molecular, bem delimitadas e sem sinais de arrastamento visíveis.

Como observável na figura 11, o DNA apresentava-se íntegro pelo que foi possível prosseguir para o procedimento subsequente, a reacção de PCR.

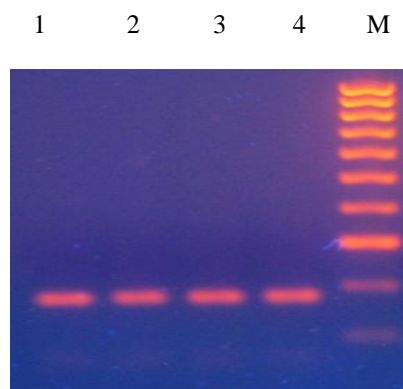


**Figura 11** – Electroforese em gel de agarose a 0,8 % do DNA genómico extraído. 1 – 5: DNA genómico de cinco dos gatos em estudo.



### 3.3 – Amplificação, por PCR, de um fragmento do gene *fGUSB*

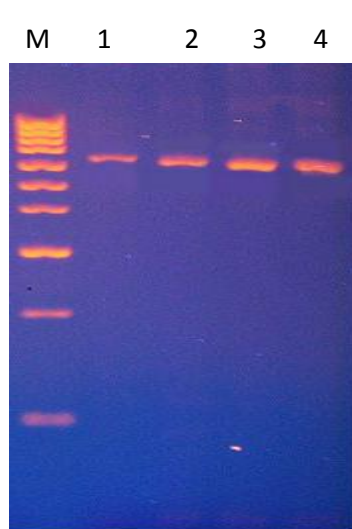
A amplificação do gene *fGUSB* foi bem-sucedida em todas as amostras em estudo (figura 12) permitindo, assim, assegurar a inexistência de inibidores da DNA polimerase que pudessem comprometer o sucesso da amplificação. Esta ausência, associada à boa integridade física dos DNAs, minimizam a probabilidade de ocorrência de resultados falso negativos na amplificação de DNA de micoplasmas hemotrópicos.



**Figura 12** – Electroforese em gel de agarose a 1,5 % de amostras com amplificação bem-sucedida para o gene *fGUSB*. 1 – 4: Produto de PCR de quatro amostras em estudo. M – Marcador de pesos moleculares Hypperladder IV (Bioline).

### 3.4 – Amplificação, por PCR, de DNA de *Mycoplasma* spp.

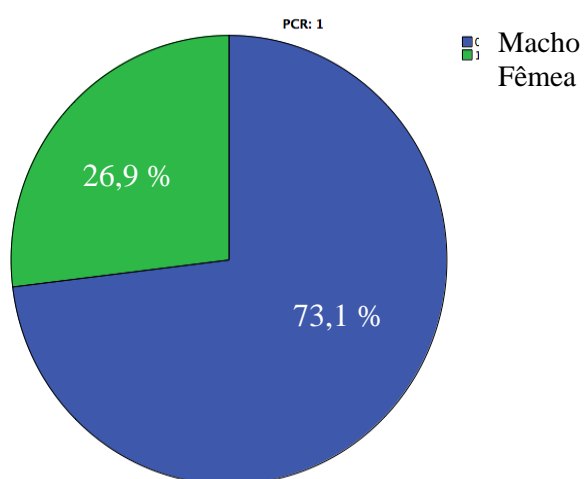
A reacção de PCR permitiu detectar DNA de *Mycoplasma* spp. em 32 dos 157 gatos estudados (figura 13), o que corresponde a uma percentagem de animais infectados de 20,4%.



**Figura 13** – Electroforese em gel de agarose a 1,5% do produto de PCR de quatro amostras com amplificação bem-sucedida para o gene *16S rRNA* de *Mycoplasma spp.* 1 – 4: Produto de PCR, M – Marcador de pesos moleculares Hypperladder IV (Bioline).

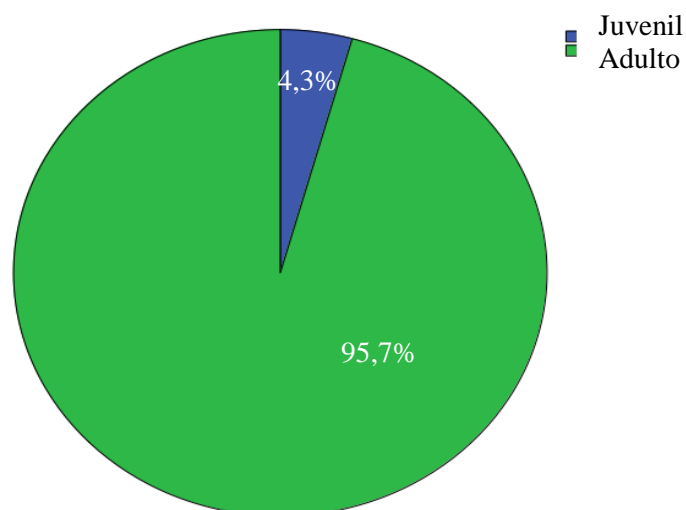
### 3.5 – Relação entre a infecção por *Mycoplasma spp.* e as variáveis categóricas

De entre os animais com resultado de PCR positivo 73,1% (19/26) eram machos e 26,9% (7/26) eram fêmeas (figura 14).



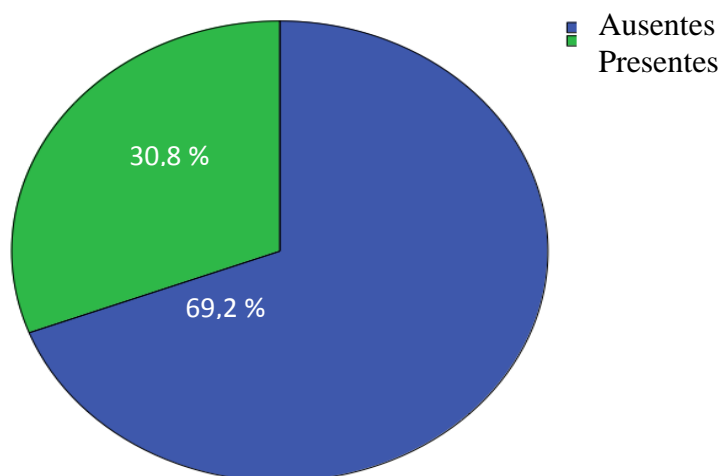
**Figura 14** – Relação entre a positividade da PCR para *Mycoplasma spp.* e o sexo dos animais.

Ainda entre os gatos com PCR positivo, 4,3% (1/23) eram juvenis e 95,7% (22/23) eram adultos (figura 15).



**Figura 15** – Relação entre a positividade da PCR para *Mycoplasma* spp. e a idade dos animais.

Relativamente à presença de pulgas, em 69,2% (18/26) dos gatos com resultado de PCR positivo não foram encontrados estes ectoparasitas, tendo sido detectados em 30,8% (8/26) dos animais positivos (figura 16).



**Figura 16** – Relação entre a positividade da PCR para *Mycoplasma* spp. e a presença de pulgas.

Foi, ainda, possível caracterizar a percentagem de alguns sinais clínicos nos gatos com resultado de PCR positivo, encontrando-se a informação disponível resumida na tabela 7.

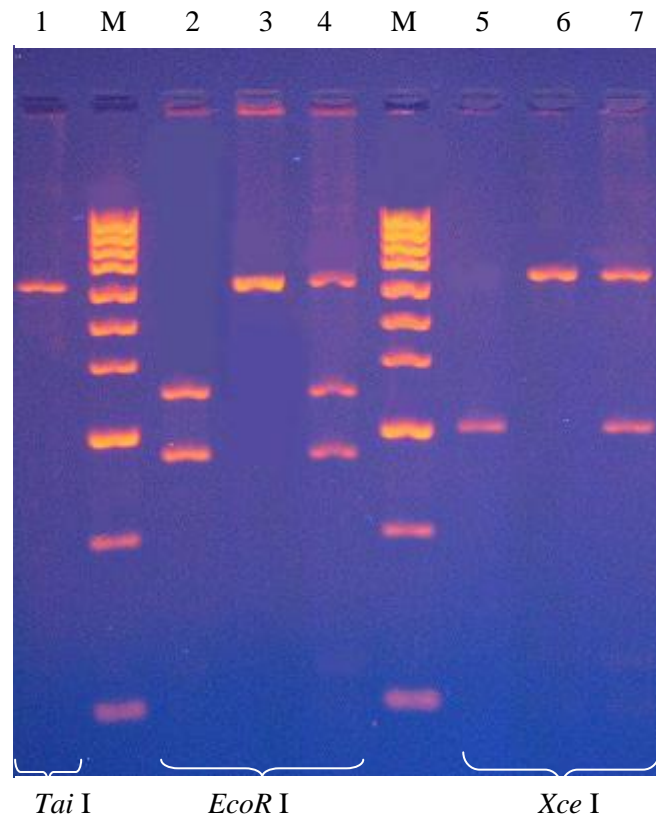
**Tabela 7** – Distribuição relativa de sinais clínicos obtidos nos gatos com resultado de PCR positivo para *Mycoplasma* spp.

Sinais Clínicos	Frequência	
	Absoluta	Relativa (%)
Lesões dérmicas	1 (n = 21)	4,8
Linfadenopatia	1 (n = 21)	4,8
Lesões oculares	0 (n = 21)	0
Atrofia muscular	0 (n = 21)	0
Epistáxis	0 (n = 21)	0
Palidez das mucosas	2 (n = 21)	9,5
Diarreia	1 (n = 20)	5
Outros	3 (n = 21)	14,3

### 3.6 – Identificação da espécie de hemoplasma

A hidrólise com as enzimas de restrição *Xce* I, *EcoR* I e *Tai* I (figura 17) permitiu a identificação da espécie em 87,5% (28/32) dos casos. Em quatro das amostras positivas, os perfis de restrição obtidos eram contraditórios, tendo a espécie de *Mycoplasma* spp. sido identificada por sequenciação do produto de PCR.

As frequências de cada espécie de micoplasma, em infecção única e co-infecção, no total das 157 amostras em estudo, encontram-se dispostas na tabela 8. Os dados referentes à espécie identificada para cada uma das amostras positivas na PCR encontram-se na tabela 9, em apêndice.



**Figura 17** – Gel de agarose após electroforese dos fragmentos de restrição pelas endonucleases *Tai* I, *EcoR* I e *Xce* I. 1 – ausência de hidrólise, 2 – “*Candidatus* *Mycoplasma haemominutum*”, 3 – *Mycoplasma haemofelis*, 4 – “*Candidatus* *Mycoplasma haemominutum*” + *Mycoplasma haemofelis*, 5 – *Mycoplasma haemofelis*, 6 – “*Candidatus* *Mycoplasma haemominutum*”, 7 – *Mycoplasma haemofelis* + “*Candidatus* *Mycoplasma haemominutum*”. M – Marcador de pesos moleculares Hypperladder IV (Bioline).

**Tabela 8** – Frequências das diferentes espécies de hemoplasma encontradas, em infecção única e em co-infecção.

Espécie de <i>Mycoplasma</i>	Frequência	
	Absoluta (n = 157)	Relativa (%)
<i>Mycoplasma haemofelis</i> (Co + IU)	19	12,1
<i>Mycoplasma haemofelis</i> (IU)	7	4,5
Mhf + CMhm	12	7,6
“ <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ” (Co + IU)	23	14,6
“ <i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i> ” (IU)	11	7,0
“ <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> ” (IU)	2	1,3

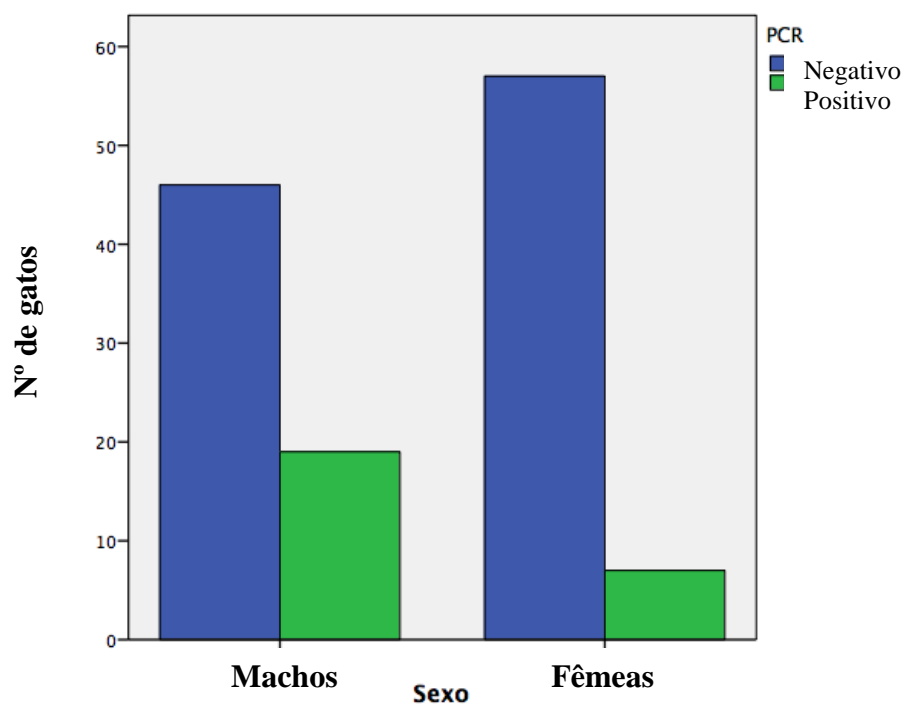
Co – co-infecção, IU – infecção única, Mhf – *Mycoplasma haemofelis*, CMhm – “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*”.

### 3.7– Avaliação de factores de risco

De forma a avaliar a existência de uma eventual associação entre as variáveis sexo, classe etária e a existência de pulgas, foi efectuado o teste de Qui-Quadrado. Os factores analisados cujos resultados de significância (p) eram inferiores ou iguais a 0,05 foram considerados como sendo estatisticamente significativos.

#### 3.7.1 – Sexo

Foi observada uma relação estatisticamente significativa entre as variáveis infecção por *Mycoplasma* spp. e sexo (p = 0,008). Como se pode ver pela figura 18, o número de machos infectados com *Mycoplasma* spp. é bastante superior ao das fêmeas.

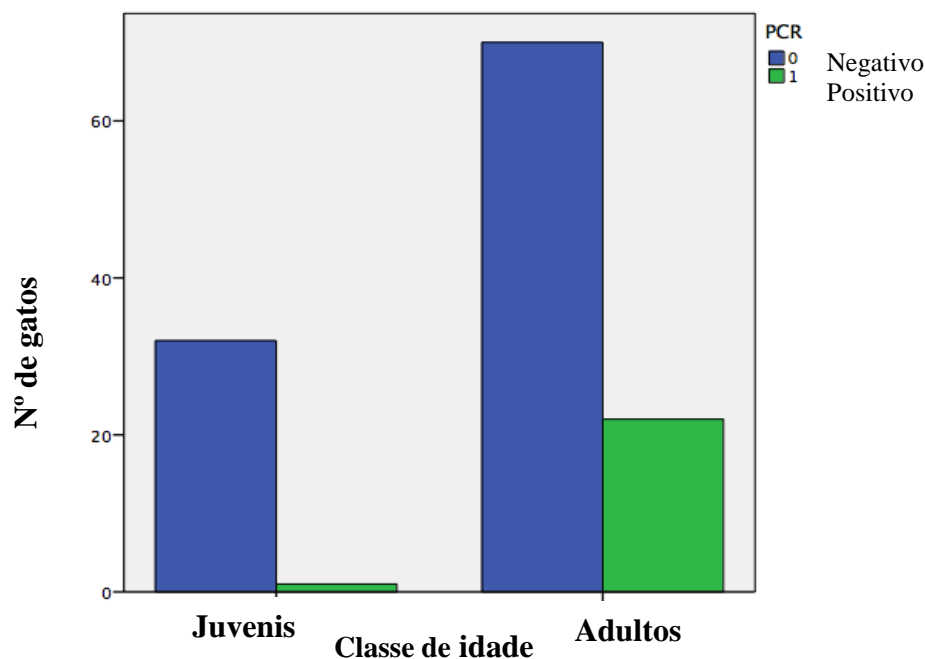


**Figura 18** – Relação entre a presença de infecção por *Mycoplasma* spp. e o sexo enquanto factor de risco.

Devido à existência de relação estatística entre sexo e presença de infecção por *Mycoplasma* spp., foi, então, calculado o risco. O valor obtido foi de 2,673 com um intervalo de confiança a 95% [1,207;5,917], traduzindo-se num risco acrescido, de igual valor, para machos.

### 3.7.2 – Classe de idade

Foi, também, observada uma relação estatisticamente significativa entre as variáveis infecção por *Mycoplasma* spp. e classe de idade ( $p = 0,004$ ). Como se pode ver pela figura 19, o número de animais adultos infectados com *Mycoplasma* spp. é bastante superior ao dos animais juvenis.



**Figura 19** – Relação entre a infecção por *Mycoplasma* spp.e a classe de idade enquanto factor de risco.

Devido à existência de relação estatística entre a classe de idade e o resultado positivo para *Mycoplasma* spp. foi, então, calculado o risco. O valor obtido foi de 0,127 com um intervalo de confiança a 95% [0,018;0,903], sendo o risco acrescido para animais mais velhos.

### 3.7.3 – Presença de Pulgas

Não foi encontrada nenhuma relação estatisticamente significativa entre a variável presença de pulgas e a positividade da PCR para *Mycoplasma* spp. ( $p = 0,435$ ).

### 3.7.4 – Variáveis intrínsecas e sua relação com a infecção por *Mycoplasma* spp.

Para os animais infectados, foi avaliada a existência de uma eventual relação entre as variáveis intrínsecas dos animais, como o sexo, a idade, a presença de pulgas, a espécie de hemoplasma infectante e os sinais clínicos, não tendo sido encontrado nada significativo a nível estatístico.



## 4 – Discussão dos resultados

A micoplasmose felina, também denominada de Anemia Infecciosa Felina, é uma doença causada por bactérias ubíquas pertencentes ao género *Mycoplasma*. Com o presente trabalho pretendeu-se avaliar a presença de infecção por estes agentes numa população de gatos errantes residente na Ilha de Faro, através da amplificação, por PCR, de DNA destas bactérias em amostras de sangue total.

No presente estudo foi encontrada uma percentagem de infecção por *Mycoplasma* spp. de 20,4%, valor semelhante ao descrito em vários países da Europa (Tasker *et al.*, 2003b; Bauer *et al.*, 2008; Gentilini *et al.*, 2009; Maher *et al.*, 2010), nos EUA (Sykes *et al.*, 2007) e no Japão (Tanahara *et al.*, 2010). Noutros estudos, foram obtidas prevalências de infecção por *Mycoplasma* spp. superiores, variando entre 38% e 58,3%, em países como o Canadá (Kewish *et al.*, 2004), a África do Sul (Lobetti & Tasker, 2004) e o Japão (Fujihara *et al.*, 2007). Em Portugal, no Centro e Sul do País, Duarte e colaboradores (2014) identificaram a infecção por estes agentes em 27,1% dos gatos estudados. Já no Centro e Norte de Portugal, Martinez-Diaz e colaboradores (2013) detectaram 43,44% de animais com resultado positivo para *Mycoplasma* spp. Esta disparidade de resultados poderá ser devida, não só ao diferente número de animais envolvidos, como ao facto de estes autores terem incluído no seu estudo, além de gatos errantes, também animais de abrigo. A zona geográfica em estudo foi, igualmente, diferente, tendo, ainda, a população do presente trabalho a característica única de se encontrar geograficamente isolada. Todas estas diferenças condicionam e limitam a comparação dos diferentes resultados.

No presente trabalho, a espécie de hemoplasma encontrada em maior percentagem de infecção única foi “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” com um valor de 7%, como seria de esperar por ser, normalmente, a mais prevalente. *Mycoplasma haemofelis*, com um valor de 4,5%, foi a segunda espécie mais identificada. A espécie “*Candidatus Mycoplasma turicensis*” foi detectada no presente estudo em 1,3% das amostras estudadas (tabela 8). Os dois estudos efectuados em Portugal em que foi descrita infecção única com este último agente referem valores de 0,6% (Martinez-Diaz *et al.*, 2013) e 0,8% (Duarte *et al.*, 2014). Em vários estudos pelo mundo, os valores descritos para a taxa de infecção única por este micoplasma, em

gatos, são muito baixos (0 – 4%) e próximos do obtido neste trabalho. Todavia, de acordo com Willi e colaboradores (2006a), foram descritas percentagens deste hemoplasma mais elevadas na Austrália (10 %) e na África do Sul (26 %). No que diz respeito à co-infecção, esta espécie aparece, frequentemente, descrita em infecções com uma ou mais espécies de hemoplasma descritas em gatos (Fujihara *et al.*, 2007; Peters *et al.*, 2008; Tanahara *et al.*, 2010; Georges *et al.*, 2012; Jenkins *et al.*, 2013).

A percentagem total de infecção por “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” do presente estudo (14,6%) é bastante inferior à encontrada no estudo de Martinez-Diaz *et al.* (2013) (61,8 %) e um pouco inferior à de Duarte *et al.* (2014) (17,8%). A percentagem total de *Mycoplasma haemofelis* (12,1%) é ligeiramente inferior à encontrada nos dois estudos supracitados (14,1% e 14,4 %, respectivamente), sendo, também, inferior à descrita por Pais (2013) (20,7%). É, ainda, bastante inferior à encontrada num estudo efectuado em Portugal, em animais suspeitos de ter hemoplasmoses atendidos num hospital veterinário na Parede (69,7%), mas que apresentava uma amostra reduzida e com animais que se supunha terem a infecção, o que não era o caso do presente trabalho. No presente estudo foi encontrada infecção mista por *Mycoplasma haemofelis* e por “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” em 7,6% das amostras (tabela 8). Esta percentagem é muito inferior à descrita nos dois principais artigos sobre hemoplasmoses no País, anteriormente referidos. Mais uma vez, as diferenças existentes entre as populações estudadas, nomeadamente no que respeita à sua dimensão e características epidemiológicas, podem justificar a desigualdade nas taxas de infecção descritas. Ainda assim, globalmente, a percentagem total de hemoplasmas obtida no presente estudo é próxima da obtida em vários países com climas idênticos ao do Sul do País e em populações cujo estado de saúde é desconhecido (Criado Fornelio *et al.*, 2003; Luria *et al.*, 2004; Gentilini *et al.*, 2009).

A região vulgarmente conhecida como “Ilha de Faro” ou “Praia de Faro” é uma península natural, de pequenas dimensões, acessível apenas por uma estreita passagem a partir de terra, localizada na cidade de Faro. Possui um clima de tipo mediterrânico, com temperaturas amenas ao longo de todo o ano (Change for Animal Foundation, s.d.). A colónia de gatos aí residente encontra-se isolada, não se verificando a entrada de animais do exterior. Fora da época de Verão (única altura em que se verificam grandes movimentações de turistas), a alimentação disponível para os gatos é escassa,

dependendo, essencialmente, do que lhes é disponibilizado pela comunidade local de pescadores. Numa população com estas características, poderia ser expectável uma elevada taxa de infecção por *Mycoplasma* spp. Este cenário, contudo, não se confirmou, o que poderá, eventualmente, ficar a dever-se a: i) elevadas taxas de morbilidade e mortalidade decorrentes da subnutrição e, consequente, imunossupressão, principalmente entre o Outono e a Primavera, ii) o facto de a colheita das amostras ter coincidido com o fim da época balnear, altura em que os animais se encontram melhor nutridos e com o sistema imunitário mais competente para lidar com a infecção e iii) a possibilidade de a população ter atingido um nível *plateau*/estacionário ou de equilíbrio, uma vez que não existindo migração natural de novos animais, poderão existir hierarquias bem estabelecidas e menos casos de lutas entre animais. A estas razões pode, ainda, juntar-se o desconhecimento sobre a distribuição de ectoparasitas, como pulgas e carraças, apontadas, por alguns autores, como potenciais vectores da hemoplasmose.

No caso dos animais com resultado positivo, o sinal clínico mais compatível com a infecção seria a palidez das mucosas, a qual deveria resultar da anemia provocada pelos agentes micoplásmicos. No entanto, e tendo em conta a população estudada, a anemia por si só, poderia existir devido a outros factores. Tratando-se de uma população de gatos errantes, e devido a um maior número de comportamentos de risco por eles exibidos, quando em comparação com animais urbanos, com proprietário e acesso controlado ao exterior, é possível supor a existência de uma maior probabilidade de exposição a agentes infecciosos vários, que podem, também, provocar anemia e outros sinais clínicos compatíveis com hemoplasmose. Porém, os sinais clínicos considerados no presente estudo (lesões dérmicas, linfadenopatia, lesões oculares, atrofia muscular, epistaxis, palidez das mucosas e outros – apêndice I), foram encontrados, de acordo com a informação contida nas fichas de registo, em poucos animais positivos para hemoplasmose (tabela 7). Tal facto pode justificar-se pela reduzida quantidade de dados existentes para os vários indivíduos estudados e a não relação de alguns destes sinais clínicos com a doença em estudo. Além disso, tal como referido anteriormente, muitos dos animais com hemoplasmose são portadores assintomáticos, não apresentando sinais clínicos visíveis, muitas vezes só os desenvolvendo quando em presença de doenças

concomitantes que envolvam algum grau de imunossupressão (infecção por FIV e FeLV), situações de stress, lutas com outros animais e terapêuticas imunossupressoras.

No presente estudo foi realizada uma avaliação de factores de risco para a hemoplasmose, nomeadamente o sexo, a idade e a presença de ectoparasitas. Os resultados obtidos sugerem que ser macho é um factor de risco ( $p = 0,008$ ), o que está de acordo com o descrito por diversos autores (Tasker *et al.*, 2003b, 2004; Willi *et al.*, 2006a; Bauer *et al.*, 2008; Roura *et al.*, 2010; Georges *et al.*, 2012; Jenkins *et al.*, 2013). A elevada densidade populacional destes gatos na Ilha de Faro pode levar a problemas de luta pelo território, particularmente nos machos, o que, como já referido, pode potenciar a infecção com micoplasmas hemotrópicos. A idade, neste caso o ser adulto, em comparação com os juvenis, foi considerado um factor de risco, mesmo tendo em conta o facto de a amostra estudada não ser equitativa, havendo muito mais adultos que juvenis. Ainda assim, obteve-se uma relação estatisticamente significativa com  $p = 0,004$ . Este achado faz sentido, de acordo com vários autores (Tasker *et al.*, 2003b, 2004; Maher *et al.*, 2010; Georges *et al.*, 2012; Jenkins *et al.*, 2013), uma vez que animais com mais idade, podem exibir um sistema imunitário com menor competência e menos eficaz a lidar com infecções. Além disso, observa-se um aumento progressivo da ocorrência da doença com a idade, o que poderá ser devido a um aumento de exposição ao longo da vida do animal, como sugerido por Tasker e Braddock (2004).

Entre a presença de pulgas e o resultado positivo para *Mycoplasma* spp., não foi detectada uma relação estatisticamente significativa. Todavia, apesar de não ter sido possível estabelecer essa relação, de acordo com a literatura existente, suspeita-se que as pulgas possam funcionar como vectores artrópodes de micoplasmose hemotrópica, principalmente devido à distribuição sazonal da hemoplasmose (Gentilini *et al.*, 2009) e atendendo à existência de maiores prevalências em países com climas mais quentes (Criado Fornelio *et al.*, 2003; Lobetti & Tasker, 2004; Luria *et al.*, 2004; Tasker *et al.*, 2004). As carraças não puderam ser consideradas, pois não foi encontrada nenhuma em qualquer dos animais analisados, pelo que a sua relação com os resultados não pôde ser estabelecida. De acordo com Taroura e colaboradores (2005), as carraças também podem funcionar como vectores de hemoplasmose.

As diferenças encontradas entre os valores obtidos no presente estudo e os apresentados por outros autores podem ser justificados com a heterogeneidade da dimensão das amostras e das características das populações estudadas, muito devido à utilização, por diversos autores, de amostragem de conveniência, com as amostras a incluírem só animais saudáveis, só animais doentes, com hemoplasmoses ou outras doenças, ou um misto de ambos, o que acaba por dificultar a comparação de resultados entre os diferentes estudos. O mesmo acontece, ainda, devido a diferentes técnicas de diagnóstico utilizadas, diferentes critérios de inclusão e diferentes métodos de avaliação estatística, além de questões climáticas e de distribuição de vectores artrópodes que se relacionam com as anteriores.

O presente estudo apresenta como principal limitação, a falta de dados clínicos referentes a vários animais (em virtude de um incompleto preenchimento da folha de registo), impedindo a inferência de mais conclusões que melhor pudessem elucidar sobre o tema. O recurso à técnica de PCR quantitativa, poderia ter permitido obter informação sobre a quantidade de bactérias em circulação e, assim, ajudar a esclarecer a importância clínica da infecção.

O presente trabalho revela-se particularmente importante, tendo em conta o reduzido número de estudos efectuados em Portugal sobre esta temática, contribuindo para o aumento do conhecimento existente sobre esta infecção no nosso País. O estudo refere-se a uma região onde nenhuma pesquisa semelhante havia, ainda, sido efectuada, permitindo, assim, conhecer melhor a realidade nacional, no que concerne à infecção provocada pelos micoplasmas hemotrópicos em gatos. O isolamento geográfico da população estudada torna-a, ainda, um excelente modelo para estudos epidemiológicos.

## 5 – Conclusão

O estudo dos micoplasmas hemotrópicos felinos é importante porquanto se trata de agentes com uma distribuição mundial, ubiqüitários e com prevalências relativamente elevadas. A sua relevância clínica pode ser de difícil avaliação, pois nem todos os animais em que são detectados os agentes estão, efectivamente, doentes. Esta relevância vai depender de vários factores que deverão ser analisados de forma atenta, nomeadamente a espécie de hemoplasma, a carga de microorganismo infectante, a presença de diferentes isolados e a condição imunitária do animal. Estas bactérias são, geralmente, consideradas de patogenicidade reduzida com excepção de *Mycoplasma haemofelis*, que parece causar anemias hemolíticas mais graves e potencialmente fatais.

Os objectivos determinados para a presente dissertação foram atingidos com sucesso, na medida em que foi possível identificar, não só a presença de micoplasmas hemotrópicos em 20,4% da população estudada, como identificar a espécie de todos os isolados.

O trabalho experimental desenvolvido permitiu aumentar o conhecimento do panorama nacional, seja no que se refere à infecção por micoplasmas hemotrópicos em gatos errantes, seja no que se refere à distribuição geral e das diferentes espécies, assim como aos factores de risco.

Pelo facto de o diagnóstico de hemoplasmose ser complexo, devido à falta de um estado de bacteriémia que seja facilmente identificável em infecções latentes e crónicas, assim como a rápida perda de bacteriémia na altura do aparecimento dos sinais clínicos em gatos infectados de forma aguda, é importante aprofundar a investigação nesta área, não só de forma a desenvolver novos métodos de diagnóstico mais rápidos, sensíveis e menos dispendiosos, como a aprofundar o conhecimento dos mecanismos de patogenicidade e evasão ao sistema imunitário do hospedeiro.

## 6 – Referências bibliográficas

- Alleman, A. R., Pate, M. G., Harvey, J. W., Gaskin, J. M., & Barbet, A. F. (1999). Western Immunoblot Analysis of the Antigens of *Haemobartonella felis* with Sera from Experimentally Infected Cats. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(5), 1474-1479.
- Archer, G. L., Coleman, P. H., Cole, R. M., Duma, R. J., & Johnston, C. L. (1979). Human Infection from an Unidentified Erythrocyte-Associated Bacterium. *New England Journal of Medicine*, 301(17), 897-900.
- Balazs, T., Robinson, J., Grey, D., Grice, H.C. (1961) Feline Haemobartonellosis - A Case Report. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science*, 25(9), 220-222.
- Barfield, D., & Adamantos, S. (2011). Feline blood transfusions: A Pinker Shade of Pale. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 13(1), 11-23.
- Barker, E. N., Helps, C. R., Heesom, K. J., Arthur, C. J., Peters, I. R., Hofmann-Lehmann, R., & Tasker, S. (2010). Detection of Humoral Response Using a Recombinant Heat Shock Protein 70, DnaK, of *Mycoplasma haemofelis* in Experimentally and Naturally Hemoplasma-Infected Cats. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(12), 1926-1932.
- Barker, E. N., Darby, A., Helps, C., Peters, I., Heesom, K., Arthur, C., Crossett, B., *et al.* (2011). Molecular characterization of the uncultivable hemotropic bacterium *Mycoplasma haemofelis*. *Veterinary Research*, 42(1), 83.
- Barker, E., & Tasker, S. (2013). Haemoplasmas: Lessons learnt from cats. *New Zealand Veterinary Journal*, 61(4), 184-192.
- Bauer, N., Balzer, H., Thüre, S., & Moritz, A. (2008). Prevalence of feline haemotropic mycoplasmas in convenience samples of cats in Germany. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 10(3), 252-258.
- Baumann, J., Novacco, M., Willi, B., Riond, B., Meli, M. L., Boretti, F. S., & Hofmann-Lehmann, R. (2015). Lack of cross-protection against *Mycoplasma haemofelis* infection and signs of enhancement in “*Candidatus Mycoplasma turicensis*”- recovered cats. *Veterinary Research*, 46(1), 104.

Bobade, P., & Nash, A. (1987). A comparative study of the efficiency of Acridine Orange and some Romanowsky staining procedures in the demonstration of *Haemobartonella felis* in feline blood. *Veterinary Parasitology*, 26(1-2), 169-172.

Bosnic, D., Baresic, M., Anic, B., Sentic, M., Cerovec, M., Mayer, M., & Cikes, N. (2010). Rare zoonosis (hemotrophic mycoplasma infection) in a newly diagnosed systemic lupus erythematosus patient followed by a *Nocardia asteroides* pneumonia. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 14(1), 92-95.

Braddock, J., & Tasker, S. (2004). The use of real-time PCR in the diagnosis and monitoring of *Mycoplasma haemofelis* copy number in a naturally infected cat. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 6(3), 161-165.

Braga, M., André, M., Freschi, C., Teixeira, M., & Machado, R. (2012). Molecular detection of hemoplasma infection among cats from São Luís island, Maranhão, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(2), 569-575.

Change for Animals Foundation (s.d.). Praia de Faro community project. Acedido em 20 de Maio de 2016 em <http://www.changeforanimals.org/praiade-faro-project>.

Criado-Fornelio, A., Martinez-Marcos, A., Buling-Saraña, A., & Barba-Carretero, J. (2003). Presence of *Mycoplasma haemofelis*, *Mycoplasma haemominutum* and piroplasmids in cats from southern Europe: a molecular study. *Veterinary Microbiology*, 93(4), 307-317.

De Lorimier, L., & Messick, J. B. (2004). Anemia Associated With 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' in a Feline Leukemia Virus-Negative Cat With Lymphoma. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 40(5), 423-427.

Dean, R. S., Helps, C. R., Jones, T. J., & Tasker, S. (2008). Use of real-time PCR to detect *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' in the saliva and salivary glands of haemoplasma-infected cats. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 10(4), 413-417.

dos Santos, A., Pires dos Santos, R., Biondo, A. W., Dora, J. M., Goldani, L. Z., Tostes de Oliveira, S., & Messick, J. B. (2008). Hemoplasma Infection in HIV-positive Patient, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 14(12), 1922-1924.

Dowers, K. L., Olver, C., Radecki, S. V., & Lappin, M. R. (2002). Use of enrofloxacin for treatment of large-form *Haemobartonella felis* in experimentally infected cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 221(2), 250-253.



Duarte, A., Marques, V., Correia, J. H., Neto, I., Bráz, B. S., Rodrigues, C., Martins, T., *et al.* (2015). Molecular detection of haemotropic Mycoplasma species in urban and rural cats from Portugal. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 17(6), 516-522.

Felder, K. M., Hoelzle, K., Ritzmann, M., Kilchling, T., Schiele, D., Heinritzi, K., Groebel, K. *et al.* (2011). Hemotrophic Mycoplasmas Induce Programmed Cell Death in Red Blood Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 27(5), 557-564.

Flint, J. C. & McKelvie, D. H. (1955). Feline infectious anemia – diagnosis and treatment procedures. Comunicação apresentada no Practical 92nd Annual Meeting American Veterinary Medical Association, Minneapolis, EUA.

Flint, J. C., & Moss, L. C. (1953). Infectious anemia in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 122, 45-48.

Foley, J. E., & Pedersen, N. C. (2001). 'Candidatus Mycoplasma haemominutum', a low virulence epierthrocytic parasite of cats. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3), 815-817.

Fujihara, M., Watanabe, M., Yamada, T., Harasawa, R., *et al.* (2007). Occurrence of 'Candidatus Mycoplasma turicensis' Infection in Domestic Cats in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 69(10), 1061-1063.

Gary, A., Richmond, H., Tasker, S., Hackett, T., & Lappin, M. (2006). Survival of *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' in blood of cats used for transfusions. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 8(5), 321-326.

Gentilini, F., Novacco, M., Turba, M. E., Willi, B., Bacci, M. L., & Hofmann-Lehmann, R. (2009). Use of combined conventional and real-time PCR to determine the epidemiology of feline haemoplasma infections in northern Italy. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 11(4), 277-285.

George, J. W., Rideout, B. A., Griffey, S. M., & Pedersen, N. C. (2002). Effect of preexisting FeLV infection or FeLV and feline immunodeficiency virus coinfection on pathogenicity of the small variant of *Haemobartonella felis* in cats. *American Journal of Veterinary Research*, 63(8), 1172-1178.

Georges, K., Ezeokoli, C., Auguste, T., Seepersad, N., Pottinger, A., Sparagano, O., & Tasker, S. (2012). A comparison of real-time PCR and reverse

line blot hybridization in detecting feline haemoplasmas of domestic cats and an analysis of risk factors associated with haemoplasma infections. *BMC Veterinary Research*, 8(1), 103.

Giger, Urs. (2005). Hemotropic Mycoplasmosis (Hemobartonellosis) in *Ettinger & Feldman Textbook of Veterinary Internal Medicine Volume 2 Chapter 270 – Regenerative Anemia caused by Blood Loss or Hemolysis* (6th ed., pp. 1902 – 1903):Elsevier/Saunders.

Groebel, K., Hoelzle, K., Wittenbrink, M. M., Ziegler, U., & Hoelzle, L. E. (2009). *Mycoplasma suis* Invades Porcine Erythrocytes. *Infection and Immunity*, 77(2), 576-584.

Harbutt, P. R. (1963). A clinical appraisal of Feline Infectious Anemia and its transmission under natural conditions. *Australian Veterinary Journal*, 39(10), 401-404.

Harrus, S., Klement, E., Aroch, I., Stein, T., Bark, H., Lavy, E., Mazaki-Tovi, M., *et al.* (2002). Retrospective study of 46 cases of feline haemobartonellosis in Israel and their relationships with FeLV and FIV infections. *Veterinary Record*, 151(3), 82-85.

Hicks, C., Barker, E., Brady, C., Stokes, C., Helps, C., & Tasker, S. (2014a). Non-ribosomal phylogenetic exploration of Mollicute species: New insights into haemoplasma taxonomy. *Infection, Genetics and Evolution*, 23, 99-105.

Hicks, C. A., Willi, B., Riond, B., Novacco, M., Meli, M. L., Stokes, C. R., Helps, C. R., *et al.* (2014b). Protective Immunity against Infection with *Mycoplasma haemofelis*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 22(1), 108-118.

Hornok, S., Meli, M., Gönczi, E., Ignits, É., Willi, B., Lutz, H., & Hofmann-Lehmann, R. (2008). First molecular identification of ‘*Candidatus Mycoplasma haemominutum*’ from a cat with fatal haemolytic anaemia in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica*, 56(4), 441-450.

Hu, Z., Yin, J., Shen, K., Kang, W., & Chen, Q. (2009). Outbreaks of hemotropic mycoplasma infections in China. *Emerging Infectious Diseases*, 15(7), 1139-1140.

Ishak, A. M., Dowers, K. L., Cavanaugh, M. T., Powell, C. C., Hawley, J. R., Radecki, S. V., & Lappin, M. R. (2008). Marbofloxacin for the treatment of

experimentally induced *Mycoplasma haemofelis* infection in cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22(2), 288-292.

Jenkins, K. S., Dittmer, K. E., Marshall, J. C., & Tasker, S. (2013). Prevalence and risk factor analysis of feline haemoplasma infection in New Zealand domestic cats using a real-time PCR assay. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 15(12), 1063-1069.

Kamrani, A., Parreira, V. R., Greenwood, J., & Prescott, J. F. (2008). The prevalence of *Bartonella*, hemoplasma, and *Rickettsia felis* infections in domestic cats and in cat fleas in Ontario. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 72(5), 411-419.

Kewish, K. E., Appleyard, G. D., Myers, S. L., Kidney, B. A., & Jackson, M. L. (2004). *Mycoplasma haemofelis* and *Mycoplasma haemominutum* detection by polymerase chain reaction in cats from Saskatchewan and Alberta. *Canadian Veterinary Journal*, 45(9), 749-752.

Lobetti, R., & Tasker, S. (2004). Diagnosis of feline haemoplasma infection using a real-time PCR assay. *Journal of the South African Veterinary Association*, 75(2), 94-99.

Luria, B. J., Levy, J. K., Lappin, M. R., Breitschwerdt, E. B., Legendre, A. M., Hernandez, J. A., Gorman, S. P., *et al.* (2004). Prevalence of infectious diseases in feral cats in Northern Florida. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 6(5), 287-296.

Macieira, D. B., de Menezes R. de, C., Damico, C. B., Almosny, N. R., McLane, H. L., Daggy, J. K., & Messick, J. B. (2008). Prevalence and risk factors for hemoplasmas in domestic cats naturally infected with feline immunodeficiency virus and/or feline leukemia virus in Rio de Janeiro – Brazil. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 10(2), 120-129.

Maede, Y., & Hata, R. (1975). Studies on Feline Haemobartonellosis: II. The Mechanism of Anemia Produced by Infection with *Haemobartonella felis*. *The Japanese Journal of Veterinary Science*, 37(1), 49-54.

Maede, Y., & Sonoda, M. (1975). Studies on Feline Haemobartonellosis: III. Scanning Electron Microscopy of *Haemobartonella felis*. *The Japanese Journal of Veterinary Science*, 37(2), 209-211.

Maede, Y. (1975). Studies on Feline Haemobartonellosis: IV. Lifespan of Erythrocytes of Cats Infected with *Haemobartonella felis*. *The Japanese Journal of Veterinary Science*, 37(5), 269-272.

Maede, Y. (1978). Studies on Feline Haemobartonellosis : V. Role of the Spleen in Cats Infected with *Haemobartonella felis*. *The Japanese Journal of Veterinary Science*, 40(2), 141-146.

Maede, Y., & Murata, H. (1978). Ultrastructural Observation on the Removal of *Haemobartonella felis* from Erythrocytes in the Spleen of a Cat. *The Japanese Journal of Veterinary Science*, 40(2), 203-205.

Maede, Y. (1980). Studies on Feline Haemobartonellosis : VI. Changes of Erythrocyte Lipids Concentration and Their Relation to Osmotic Fragility. *The Japanese Journal of Veterinary Science*, 42(3), 281-288.

Maher, I. E., Tasker, S., Polizopoulou, Z., Dasopoulou, A., Egan, K., Helps, C. R., & Papasouliotis, K. (2010). Polymerase chain reaction survey of feline haemoplasma infections in Greece. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 12(8), 601-605.

Martinez-Diaz, V. L., Silvestre-Ferreira, A. C., Vilhena, H., Pastor, J., Francino, O., & Altet, L. (2013). Prevalence and co-infection of haemotropic mycoplasmas in Portuguese cats by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 15(10), 879-885.

McGrotty, Y. L., & Knottenbelt, C. M. (2002). Oesophageal stricture in a cat due to oral administration of tetracyclines. *Journal of Small Animal Practice*, 43(5), 221-223.

Messick, J. B., Berent, L. M., & Cooper, S. K. (1998). Development and Evaluation of a PCR-Based Assay for Detection of *Haemobartonella felis* in Cats and Differentiation of *H. felis* from Related Bacteria by Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(2), 462-466.

Messick, J.B., (2004). Hemotropic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. *Veterinary Clinical. Pathology*, 33, 2-13.

Messick, J.B. & Harvey, J. W. (2011). Hemotropic Mycoplasmosis (Hemobartonellosis) in *Greene - Infectious Diseases of the Dog and Cat* (4th ed., pp. 310 - 319): Elsevier/Saunders.

Messick, J. B., & Santos, A. P. (2011). Identification, Bioinformatics Analyses, and Expression of Immunoreactive Antigens of *Mycoplasma haemofelis*. *Clinical and Vaccine Immunology*, 18(8), 1275-1281.

Museux, K., Boretti, F., S., Willi, B., Riond, B., Hoelzle, K., Hoelzle, L., E., Wittenbrink, M., *et al.* (2009). *In vivo* transmission studies of '*Candidatus Mycoplasma turicensis*' in the domestic cat. *Veterinary Research*, 40(5), 45.

Neimark, H., Johansson, K. E., Rikihisa, Y., & Tully, J. G. (2001). Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of '*Candidatus Mycoplasma haemofelis*', '*Candidatus Mycoplasma haemomuris*', '*Candidatus Mycoplasma haemosuis*' and '*Candidatus Mycoplasma wenyonii*'. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(3), 891-899.

Neimark, H., Johansson, K.E., Rikihisa, Y., & Tully, J. G. (2002). Revision of haemotrophic *Mycoplasma* species names. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52(2), 683.

Nibblett, B.M.D., Waldner, C., Taylor, S.M., Jackson, M.L., & Knorr, L.M. (2009). Anemia in cats with hemotropic mycoplasma infection: Retrospective evaluation of 23 cases (1996-2005). *Canadian Veterinary Journal*, 50(11): 1181-1185.

Nibblett, B.M.D., Waldner, C., Taylor, S.M., Jackson, M.L., Knorr, L.M. & Snead, E.C., (2010). Hemotropic mycoplasma prevalence in shelter and client-owned cats in Saskatchewan and a comparison of polymerase chain reaction (PCR) — Results from two independent laboratories. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 74(2), 91-96.

Novacco, M., Boretti, F., Wolf-Jackel, G., Riond, B., Meli, M., Willi, B., Lutz, H., *et al.* (2011). Chronic "*Candidatus Mycoplasma turicensis*" infection. *Veterinary Research*, 42(1), 59.

Novacco, M., Boretti, F., Franchini, M., Riond, B., Meli, M., & Hofmann-Lehmann, R. (2012). Protection from reinfection in "*Candidatus Mycoplasma turicensis*"- infected cats and characterization of the immune response. *Veterinary Research*, 43(1), 82.

Novacco, M., Riond, B., Meli, M. L., Grest, P., & Hofmann-Lehmann, R. (2013). Tissue sequestration of '*Candidatus Mycoplasma turicensis*'. *Veterinary Microbiology*, 167(3-4), 403-409.

Pais, A. C. (2013). *Prevalência de base hospitalar de Mycoplasma haemofelis tendo por base um hospital veterinário na cova da piedade – Almada* (Dissertação de Mestrado, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias). Acedido a 22 de Dezembro de 2015 em <http://recil.grupolusofona.pt/bitstream/handle/10437/5347/Preval%C3%Aancia%20de%20Mhf.pdf?sequence=1>.

Peters, I. R., Helps, C. R., McAuliffe, L., Neimark, H., Lappin, M. R., Gruffydd-Jones, T. J., Day, M., *et al.* (2008). RNase P RNA Gene (rnpB) Phylogeny of Hemoplasmas and Other Mycoplasma Species. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(5), 1873-1877.

Peters, I. R., Helps, C. R., Gruffydd-Jones, T. J., Day, M. J., & Tasker, S. (2010). Antigen Specificity of the Humoral Immune Response to *Mycoplasma haemofelis* Infection. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(8), 1238-1243.

Razin, S., Yogev, D., & Naot, Y. (1998). Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(4), 1094-1156.

Reynolds, C. A., & Lappin, M. R. (2007). “*Candidatus* Mycoplasma haemominutum” Infections in 21 Client-Owned Cats. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 43(5), 249-257.

Roura, X., Peters, I. R., Altet, L., Tabar, M.-D., Barker, E. N., Planellas, M., Helps, C. R., *et al.* (2010). Prevalence of Hemotropic Mycoplasmas in Healthy and Unhealthy Cats and Dogs in Spain. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 22(2), 270-274.

Sánchez-Pérez, A., Brown, G., Malik, R., Assinder, S. J., Cantlon, K., Gotsis, C., Dunbar, S., *et al.* (2013). Rapid detection of haemotropic mycoplasma infection of feline erythrocytes using a novel flow cytometric approach. *Parasites & Vectors*, 6(1), 158.

Seamer, J., & Douglas, S. W. (1959). A new blood parasite of British cats. *Veterinary Record*, 71, 405-408.

Small, E., & Ristic, M. (1971). Haemobartonellosis. *Veterinary Clinics of North America*, 1, 225-230.

Steer, J. A., Tasker, S., Barker, E. N., Jensen, J., Mitchell, J., Stocki, T., Chalker, V. J., *et al.* (2011). A novel hemotropic Mycoplasma (hemoplasma) in a patient

with hemolytic anemia and pyrexia. *Clinical Infectious Diseases*, 53(11), 147-151.

Suksai, P., Sangkachai, N., Chatsiriwech, J., Kanthasaewee, O., Sariya, L., & Chaichoun, K. (2010). Development of Multiplex Polymerase Chain Reaction for Detection of Feline Hemotropic Mycoplasma in blood and tissue specimens. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 41(6), 1447-1453.

Sykes, J. E., Ball, L. M., Bailiff, N. L., & Fry, M. M. (2005). 'Candidatus Mycoplasma haematoparvum', a novel small haemotropic mycoplasma from a dog. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1), 27-30.

Sykes, J. E., Drazenovich, N. L., Ball, L. M., & Leutenegger, C. M. (2007). Use of conventional and real-time polymerase chain reaction to determine the epidemiology of hemoplasma infections in anemic and nonanemic cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(4), 685-693.

Sykes, J. E., Owens, S. D., Terry, J. C., Lindsay, L. L., & Pusterla, N. (2008). Use of Dried Blood Smears for Detection of Feline Hemoplasmas Using Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20(5), 616-620.

Sykes, J. E. (2010). Feline hemotropic mycoplasmas. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 40(6), 1157-1170.

Sykes, J. E., Lindsay, L. L., Maggi, R. G., & Breitschwerdt, E. B. (2010). Human coinfection with *Bartonella henselae* and two hemotropic mycoplasma variants resembling *Mycoplasma ovis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(10), 3782-3785.

Tanahara, M., Miyamoto, S., Nishio, T., Yoshii, Y., Sakuma, M., Sakata, Y., Nishigaki, K., *et al.* (2010). An epidemiological survey of feline hemoplasma infection in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 72(12), 1575-1581.

Taroura, S., Shimada, Y., Sakata, Y., Miyama, T., Hiraoka, H., Watanabe, M., Itamoto, K., *et al.* (2005). Detection of DNA of "Candidatus Mycoplasma haemominutum" and *Spiroplasma* sp. in unfed ticks collected from vegetation in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 67, 1277-1279.

Tasker, S., & Lappin, M. R. (2002). *Haemobartonella felis*: recent developments in diagnosis and treatment. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 4(1), 3-11.

Tasker, S., Helps, C. R., Day, M. J., Harbour, D. A., Shaw, S. E., Harrus, S., Baneth, G., *et al.* (2003a). Phylogenetic Analysis of Hemoplasma Species: an International Study. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(8), 3877-3880.

Tasker, S., Binns, S. H., Day, M. J., Gruffydd-Jones, T. J., Harbour, D. A., Helps, C. R., Jensen, W., *et al.* (2003b). Use of a PCR assay to assess the prevalence and risk factors for *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' in cats in the United Kingdom. *Veterinary Record*, 152(7), 193-198.

Tasker, S., Helps, C. R., Day, M. J., Gruffydd-Jones, T. J., & Harbour, D. A. (2003c). Use of Real-Time PCR To Detect and Quantify *Mycoplasma haemofelis* and "Candidatus Mycoplasma haemominutum" DNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 439-441.

Tasker, S., Braddock, J. A., Baral, R., Helps, C. R., Day, M. J., Gruffydd-Jones, T. J., & Malik, R. (2004). Diagnosis of feline haemoplasma infection in Australian cats using a real-time PCR assay. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 6(6), 345-354.

Tasker, S. (2006). Current concepts in feline haemobartonellosis. *In Practice*, 28(3), 136-141.

Tasker, S., Peters, I. R., Papasouliotis, K., Cue, S. M., Willi, B., Hofmann-Lehmann, R., Gruffydd-Jones, T. J., *et al.* (2009a). Description of outcomes of experimental infection with feline haemoplasmas: Copy numbers, haematology, Coombs' testing and blood glucose concentrations. *Veterinary Microbiology*, 139 (3-4), 323-332.

Tasker, S., Peters, I. R., Day, M. J., Willi, B., Hofmann-Lehmann, R., Gruffydd-Jones, T. J., & Helps, C. R. (2009b). Distribution of *Mycoplasma haemofelis* in blood and tissues following experimental infection. *Microbial Pathogenesis*, 47(6), 334-340.

Tasker, S. (2010). Haemotropic mycoplasmas: what's their real significance in cats? *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 12(5), 369-381.

Tasker, S., Peters, I. R., Mumford, A. D., Day, M. J., Gruffydd-Jones, T. J., Day, S., Pretorius, A. M., *et al.* (2010). Investigation of human haemotropic Mycoplasma infections using a novel generic haemoplasma qPCR assay on blood samples and blood smears. *Journal of Medical Microbiology*, 59(11), 1285-1292.



Tilley, Larry P; Smith, Francis, W.K Jr. (2007). Hemotropic Hemoplasmosis (haemobartonellosis) in Blacwells's five-minute veterinary consult: Canine and Feline . (fourth edition, pp. 591): Blackwell Publishing.

Uilenberg, G., Thiaucourt, F., & Jongejan, F. (2004). On molecular taxonomy: what is in a name? *Experimental and Applied Acarology*, 32(4), 301-312.

Veir, J. K., & Lappin, M. R. (2010). Molecular Diagnostic Assays for Infectious Diseases in Cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 40(6), 1189-1200.

Vicente, A. R. A. (2015). *Caracterização clínica e laboratorial de gatos considerados suspeitos de Mycoplasma haemofelis* (Dissertação de Mestrado, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias). Acedido a 20 de Junho de 2016 em <http://recil.grupolusofona.pt/bitstream/handle/10437/7091/Disserta%C3%A7%C3%A3o%20Ana%20Vicente.pdf?sequence=1>.

Wardrop, K. J., Reine, N., Birkenheuer, A., Hale, A., Hohenhaus, A., Crawford, C., & Lappin, M. R. (2005). Canine and feline blood donor screening for infectious disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19(1), 135-142.

Watanabe, M., Hisasue, M., Souma, T., Ohshiro, S., Yamada, T., & Tsuchiya, R. (2008). Molecular Detection of *Mycoplasma haemofelis* and '*Candidatus Mycoplasma haemominutum*' Infection in Cats by Direct PCR Using Whole Blood without DNA Extraction. *Journal of Veterinary Medical Science*, 70(10), 1095-1099.

Weingart, C., Tasker, S., & Kohn, B. (2016). Infection with haemoplasma species in 22 cats with anaemia. *Journal of Feline Medicine & Surgery*, 18(2), 129-136.

Willi, B., Boretti, F. S., Cattori, V., Tasker, S., Meli, M. L., Reusch, C., Lutz, H., *et al.* (2005). Identification, Molecular Characterization, and Experimental Transmission of a New Hemoplasma Isolate from a Cat with Hemolytic Anemia in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(6), 2581-2585.

Willi, B., Tasker, S., Boretti, F. S., Doherr, M. G., Cattori, V., Meli, M. L., Lobetti, R. G., *et al.* (2006a). Phylogenetic Analysis of "*Candidatus Mycoplasma turicensis*" Isolates from Pet Cats in the United Kingdom,

Australia, and South Africa, with Analysis of Risk Factors for Infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(12), 4430-4435.

Willi, B., Boretti, F. S., Baumgartner, C., Tasker, S., Wenger, B., Cattori, V., Meli, M. L., Reusch, C. E., Lutz, H., & Hofmann-Lehmann, R., *et al.* (2006b). Prevalence, Risk Factor Analysis, and Follow-Up of Infections Caused by Three Feline Hemoplasma Species in Cats in Switzerland. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(3), 961-969.

Willi, B., Boretti, F. S., Meli, M. L., Bernasconi, M. V., Casati, S., Hegglin, D., Puorger, M., *et al.* (2007a). Real-Time PCR Investigation of Potential Vectors, Reservoirs, and Shedding Patterns of Feline Hemotropic Mycoplasmas. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(12), 3798-3802.

Willi, B., Boretti, F. S., Tasker, S., Meli, M. L., Wengi, N., Reusch, C. E., Lutz, H., *et al.* (2007b). From *Haemobartonella* to hemoplasma: molecular methods provide new insights. *Veterinary Microbiology* 125(3-4), 197-209.

Willi, B., Filoni, C., Catao-Dias, J. L., Cattori, V., Meli, M. L., Vargas, A., Martinez, F., *et al.* (2007c). Worldwide occurrence of feline hemoplasma infections in wild felid species. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(4), 1159-1166.

Willi, B., Museux, K., Novacco, M., Schraner, E. M., Wild, P., Groebel, K., Ziegler, U., *et al.* (2011). First morphological characterization of ‘*Candidatus* Mycoplasma turicensis’ using electron microscopy. *Veterinary Microbiology*, 149 (3-4), 367-373.

Wolf-Jäckel, G. A., Jäckel, C., Museux, K., Hoelzle, K., Tasker, S., Lutz, H., & Hofmann-Lehmann, R. (2010). Identification, Characterization, and Application of a Recombinant Antigen for the Serological Investigation of Feline Hemotropic Mycoplasma Infections. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(12), 1917-1925.

Wolf-Jäckel, G. A., Cattori, V., Geret, C. P., Novacco, M., Meli, M. L., Riond, B., Boretti, F. S., *et al.* (2012). Quantification of the humoral immune response and hemoplasma blood and tissue loads in cats coinfecting with ‘*Candidatus* Mycoplasma haemominutum’ and feline leukemia virus. *Microbial Pathogenesis*, 53(2), 74-80.

Woods, J. E., Brewer, M. M., Hawley, J. R., Wisnewski, N., & Lappin, M. R. (2005). Evaluation of experimental transmission of “*Candidatus* Mycoplasma haemominutum” and *Mycoplasma haemofelis* by *Ctenocephalides felis* to cats. *American Journal of Veterinary Research*, 66(6), 1008-1012.

Woods, J. E., Wisnewski, N., & Lappin, M. R. (2006). Attempted transmission of “*Candidatus* Mycoplasma haemominutum” and *Mycoplasma haemofelis* by

feeding cats infected *Ctenocephalides felis*. *American Journal of Veterinary Research*, 67(3), 494-497.

Yang, D., Tai, X., Qiu, Y., & Yun, S. (2000). Prevalence of *Eperythrozoon* spp. infection and congenital eperythrozoonosis in humans in Inner Mongolia, China. *Epidemiology and Infection*, 125(2), 421-426.

Yuan, C. L., Liang, A., Yu, F., Yang, Z., Li, Z., Zhu, J., Cui, L., *et al.* (2007). *Eperythrozoon* infection identified in an unknown aetiology anaemia patient. *Annals of Microbiology*, 57(3), 467-469.

Yuan, C. L., Liang, A. B., Yao, C. B., Yang, Z. B., Zhu, J. G., Cui, L., Yu, F., *et al.* (2009). Prevalence of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) infection in swine and swine-farm workers in Shanghai, China. *American Journal of Veterinary Research*, 70(7), 890-894.

# APÊNDICE I

## Folha de identificação e registo individual de cada animal

### Projecto “ Gatos da Ilha de Faro”

Identificação do animal \_\_\_\_\_

Data da colheita \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Idade:** Juvenil (< 1 ano) ☐ Adulto(> 1 ano) ☐ Sênior (> 10 anos) ☐

**Sexo:** Masculino ☐ Feminino ☐

**Presença de carraças:**

Não ☐ Sim ☐

**Presença de pulgas:**

Não ☐ Sim ☐

**Sinais clínicos presentes:**

	Sim	Não
Lesões dérmicas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Linfadenopatia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Lesões oculares	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Atrofia muscular	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Epistáxis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Palidez das mucosas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Diarreia	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Outros sinais clínicos: \_\_\_\_\_

**Produto recolhido:**

	Sim	Não
Sangue em EDTA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sangue em tubo seco	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Fezes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Órgãos genitais	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pele da orelha	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Carraças	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Pulgas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Outras amostras \_\_\_\_\_

## APÊNDICE II

**Tabela 9** – Espécies de micoplasmas hemotrópicos presentes nas amostras com amplificação positiva.

Identificação da amostra	Espécies encontradas
Amostra 10	CMt
Amostra 14	Mhf
Amostra 15	CMhm
Amostra 24	Mhf
Amostra 25	Mhf
Amostra 26	CMhm
Amostra 40	CMhm
Amostra 41	CMhm
Amostra 43	Mhf e CMhm
Amostra 49	Mhf e CMhm
Amostra 51	Mhf
Amostra 59	Mhf
Amostra 63	Mhf e CMhm
Amostra 86	Mhf e CMhm
Amostra 88	CMhm
Amostra 94	Mhf e CMhm
Amostra 95	CMhm
Amostra 98	Mhf
Amostra 100	Mhf e CMhm
Amostra 103	Mhf e CMhm
Amostra 105	CMt
Amostra 111	CMhm
Amostra 120	CMhm

<b>Amostra 125</b>	Mhf e CMhm
<b>Amostra 128</b>	CMhm
<b>Amostra 130</b>	Mhf e CMhm
<b>Amostra 131</b>	Mhf e CMhm
<b>Amostra 132</b>	CMhm
<b>Amostra 134</b>	Mhf e CMhm
<b>Amostra 136</b>	Mhf
<b>Amostra 141</b>	CMhm
<b>Amostra 164</b>	Mhf e CMhm

---

Mhf – *Mycoplasma haemofelis*, CMhm – “*Candidatus* *Mycoplasma haemominutum*”, CMt – “*Candidatus* *Mycoplasma turicensis*”.

## APÊNDICE III

**Tabela 10** – Resumo dos dados recolhidos para cada um dos gatos positivos para *Mycoplasma* spp.

ID Amostra	Espécie Hemoplasma	Idade	Sexo	Ectoparasitas	Sinais Clínicos
10	CMt	Sem dados	Sem dados	Sem dados	Sem dados
14	Mhf	Adulto	Macho	Não tem	Granuloma membro posterior direito
15	CMhm	Sem dados	Sem dados	Sem dados	Sem dados
24	Mhf	Adulto	Fêmea	Não tem	Sem dados
25	Mhf	Juvenil	Macho	Não tem	Seborreia
26	CMhm	Sem dados	Sem dados	Sem dados	Sem dados
40	CMhm	Adulto	Macho	Não tem	Sem dados
41	CMhm	Adulto	Macho	Pulgas	Não tem
43	Mhf e CMhm	Adulto	Fêmea	Não tem	Sem dados
49	Mhf e CMhm	Sem dados	Sem dados	Sem dados	Sem dados
51	Mhf	Adulto	Macho	Não tem	Palidez das mucosas
59	Mhf	Adulto	Fêmea	Não tem	Não tem
63	Mhf e CMhm	Adulto	Fêmea	Não tem	Não tem
86	Mhf e CMhm	Sem dados	Macho	Não tem	Lesões dermatológicas, linfadenopatia, otite
88	CMhm	Adulto	Fêmea	Pulgas	Palidez das mucosas
94	Mhf e CMhm	Sem dados	Sem dados	Sem dados	Sem dados
95	CMhm	Adulto	Macho	Não tem	Não tem
98	Mhf	Adulto	Macho	Pulgas	Não tem
100	Mhf e CMhm	Adulto	Macho	Não tem	Não tem

<b>103</b>	Mhf e CMhm	Sem dados	Sem dados	Sem dados	Sem dados
<b>105</b>	CMt	Sem dados	Macho	Não tem	Sem dados
<b>111</b>	CMhm	Adulto	Macho	Não tem	Sem dados
<b>120</b>	CMhm	Adulto	Macho	Pulgas	Não tem
<b>125</b>	Mhf e CMhm	Adulto	Macho	Não tem	Não tem
<b>128</b>	CMhm	Adulto	Macho	Não tem	Não tem
<b>130</b>	Mhf e CMhm	Adulto	Macho	Pulgas	Não tem
<b>131</b>	Mhf e CMhm	Adulto	Macho	Pulgas	Não tem
<b>132</b>	CMhm	Sem dados	Macho	Pulgas	Não tem
<b>134</b>	Mhf e CMhm	Adulto	Macho	Pulgas	Não tem
<b>136</b>	Mhf	Adulto	Fêmea	Não tem	Diarreia
<b>141</b>	CMhm	Adulto	Macho	Não tem	Não tem
<b>164</b>	Mhf e CMhm	Adulto	Fêmea	Não tem	Não tem



